UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Cinética na absorção intestinal de [^{14}C]-glutamina em
camundongos saudáveis e submetidos à endotoxemia

Mariana Lindenberg Alvarenga

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Assoc. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo

2012

Mariana Lindenberg Alvarenga

Cinética na absorção intestinal de [^{14}C]-glutamina em
camundongos saudáveis e submetidos à endotoxemia

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Assoc. Julio Orlando Tirapegui Toledo
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Junior
1º. examinador

Profa. Dra. Lisia Melo Pires Kiehl
2º. examinador

São Paulo, de de 2012.

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra a minha família
(especialmente *in memoriam* ao tio Dado)
que me deu excelentes exemplos
durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Assoc. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo pela oportunidade e pelos conhecimentos passados durante todo o tempo.

Ao Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt pela confiança na abertura das portas do laboratório para elaboração dos experimentos e por todos os ensinamentos. E, ainda, à Miriam Sant`Helena Silva e ao Guilherme Sant`Helena Silva pela paciência.

Ao Vinicius Fernandes Cruzat por ajudar desde a confecção do primeiro projeto, participar das diferentes metodologias testadas e saber me dar liberdade quando necessário.

À Ivanir por me dar força nas horas que mais precisei.

Aos colegas do laboratório de São Paulo (Lucas Pantaleão, Tatyana de Paula, Michele Caroline Trindade, Emídio Matos, Mariana Rezende, Daiana Vianna, Gabriela Fullin Resende, Luciana Nishimura, João Alfredo) que me ajudaram, acreditaram no meu trabalho e se colocaram disponíveis para qualquer auxílio.

Aos colegas de laboratório de Porto Alegre (Thiago Heck, Cintia Scholer, Claudia Vieira Marques, Rossana Rosa Porto, Gustavo Stumpf, Sophia Scomazzon, Maciel Bruxel, Aline Bittencourt, Nelson Brugger, Patrícia de Oliveira Dias, Éder Petry, Ana Lucia Hofel, Patricia Bock, Augustus Joli, Maycon de Cesare) por todos os ensinamentos e parceria nas madrugadas, nos feriados e nos finais de semana de experimentos.

À minha mãe, Ana Maria Lindenberg Alvarenga, por sempre ter acreditado em mim e me dar apoio para eu conseguir realizar tudo até agora.

À minha avó Helena Lindenberg pela motivação, pelas lições de vida e pela força.

Ao meu pai, Murilo Alvarenga Junior e esposa, Rita Valente, pelas palavras incentivadoras quando mais precisei, pelas dicas de escrita e pela revisão do inglês.

À minha família (tio Henrique Lindenberg Neto, Tio Eduardo Lindenberg – *in memoriam* –, Tia Ângela Nogueira, Tia Cecília Figueiredo, Tia Célia Figueiredo) por acreditar e entender a minha ausência por conta dos trabalhos em momentos tão especiais, como Natal e *Reveillon*.

A todos os professores que me deram bons exemplos de condutas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que financiou este projeto (Processo: 09/52853-1).

À secretaria do programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos da FCF/USP por facilitar nosso trabalho.

Ao Jorge Alves de Lima pela correção do português e pelo aperfeiçoamento do trabalho e à Elaine Midori Ychico pela formatação e pela estética.

À Leila Bonadio, da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela correção e pelo refinamento das referências bibliográficas.

À minha sócia na Globalnutri Assessoria e Consultoria em Nutrição, Fabiana Antunes Galvão, por ter tomado conta de tudo enquanto não pude me disponibilizar e pela amizade, o que me deu força para continuar nos momentos mais difíceis.

A todos os amigos que de alguma forma contribuíram com os trabalhos.

ALVARENGA, M.L. **Cinética na absorção intestinal de [¹⁴C]-glutamina em camundongos saudáveis e submetidos à endotoxemia.** Dissertação de Mestrado, 2011, p. 88 [Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos – Área de Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

RESUMO

Os diversos estudos com a suplementação de glutamina em situações de estresse fisiológico demonstram o essencial papel deste aminoácido no metabolismo. Agudamente, a suplementação com glutamina aumenta a glutaminemia. Cronicamente, verifica-se maior concentração de glutamina em tecidos, tais como o muscular e o hepático. Entretanto, não é conhecido se esses efeitos são decorrentes diretos da suplementação oral com glutamina ou da redução de sua captação a partir da membrana basolateral de enterócitos. O estudo da cinética na absorção de glutamina traz informações relacionadas à proporção da concentração de glutamina absorvida e a retida no tecido intestinal, de acordo com as doses utilizadas, e aponta quais são as alterações decorrentes da sepse induzida pela endotoxemia. O objetivo deste trabalho foi investigar a cinética de absorção de glutamina em camundongos submetidos à endotoxemia, o que não fora previamente investigado em outros trabalhos. Para avaliar a cinética da absorção intestinal de glutamina foi realizada eversão intestinal em camundongos machos, o que permite a coleta dos líquidos das camadas mucosa e serosa com maior precisão. Foram utilizadas doses de 10, 20, 40 e 50 mM de L-glutamina associada a [¹⁴C]-glutamina, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Os resultados obtidos demonstraram que em alta concentração de glutamina (50 mM) ocorre maior absorção em relação à retenção tecidual e esta é realizada por transporte ativo de aminoácidos. Os animais que foram submetidos à endotoxemia por LPS (5mg/kg) apresentaram alterações estruturais no tecido intestinal, detectadas pela histologia. Neste grupo, a retenção tecidual de glutamina foi significativamente maior do que no grupo controle, sobretudo na presença de glicose. Conclui-se que a cinética na absorção de glutamina é dose e tempo dependente em animais saudáveis e que, em condições de endotoxemia, ocorre maior retenção de glutamina no tecido intestinal na presença de glicose. Sugere-se que a via da hexosamina está envolvida; no entanto, mais estudos são necessários para esclarecer tais mecanismos.

Palavras-chave: Glutamina. Suplementação. Intestino. Absorção.

ALVARENGA, M.L. **Kinetics in the intestinal absorption of [14C] glutamine in healthy and subjected to endotoxemia mice.** Dissertação de Mestrado, 2011, p. 88 [Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos – Área de Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

ABSTRACT

The various studies of glutamine supplementation in stressful situations demonstrate the physiological role of this essential amino acid in metabolism. Acutely, supplementation with glutamine improves glutaminemia. Chronically, there is a greater concentration of glutamine in tissues such as muscle and liver. However, it is not known whether these effects are direct result of glutamine oral supplementation or reduced uptake within the basolateral membrane of enterocytes. The kinetic study of the absorption of glutamine provides information related to the ratio of concentration of glutamine absorbed and retained in the intestinal tissue, according to the doses used, and points out the changes resulting from sepsis induced by endotoxemia. The objective of this study was to investigate the kinetics of glutamine uptake in mice subjected to endotoxemia. To evaluate the kinetics of intestinal absorption of glutamine intestinal eversion was performed in male mice, allowing to collect the liquid layers of mucosa and serosa with greater precision. The doses used were 10, 20, 40 and 50 mM L-glutamine associated with [14C]-glutamine at 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 and 120 minutes. The results showed that high concentrations of glutamine (50 mM) a higher absorption occurs in relation to tissue retention and this is accomplished by active transport of amino acids. The animals subjected to endotoxemia by LPS (5mg/kg) showed structural changes in the intestinal tissue, detected by histology. In this group, the tissue retention of glutamine was significantly higher than in the control group, especially in the presence of glucose. It is concluded that the kinetics of glutamine uptake is dose and time dependent in healthy animals, and in conditions of endotoxemia, there is greater retention of glutamine in intestinal tissue in the presence of glucose. It is suggested that the hexosamine pathway is involved; however, more studies are needed to clarify these mechanisms.

Keywords: Glutamine. Supplementation. Intestine. Absorption

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Organização básica da célula intestinal.....	06
Figura 2.	Transporte de aminoácidos e peptídeos na célula intestinal.....	07
Figura 3.	Transporte e destino a partir do lúmen intestinal de glutamina, alanina e alanil-glutamina.....	09
Figura 4.	Estrutura química da glutamina e glutamato.....	11
Figura 5.	Interações bioquímicas da glutamina e glutamato.....	12
Figura 6.	Reações catalisadas pelas enzimas glutaminase e glutamina sintetase .	13
Figura 7.	Relação entre infecção, SIRS e sepse.....	17
Figura 8.	Frações intestinais padrão e evertida de camundongos.....	27
Figura 9.A.	Análise de regressão da concentração de glutamina na camada serosa em meio com 10 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	32
Figura 9.B.	Análise de regressão da concentração de glutamina na camada serosa em meio com 20 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	33
Figura 9.C.	Análise de regressão da concentração de glutamina na camada serosa em meio com 40 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	33
Figura 9.D.	Análise de regressão da concentração de glutamina na camada serosa em meio com 50 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	34
Figura 10.A.	Análise de regressão da concentração de glutamina no tecido intestinal em meio com 10 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	36
Figura 10.B.	Análise de regressão da concentração de glutamina no tecido intestinal em meio com 20 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	36

Figura 10.C.	Análise de regressão da concentração de glutamina no tecido intestinal em meio com 40 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	37
Figura 10.D.	Análise de regressão da concentração de glutamina no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	37
Figura 11.A.	Análise de regressão da concentração de glutamina na camada mucosa em meio com 10 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	39
Figura 11.B.	Análise de regressão da concentração de glutamina na camada mucosa em meio com 20 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	40
Figura 11.C.	Análise de regressão da concentração de glutamina na camada mucosa em meio com 40 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	40
Figura 11.D.	Análise de regressão da concentração de glutamina na camada mucosa em meio com 50 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	41
Figura 12.A.	Concentração de glutamina na camada serosa e no tecido intestinal em meio com 10 mM de glutamina nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	43
Figura 12.B.	Concentração de glutamina na camada serosa e no tecido intestinal em meio com 20 mM de glutamina nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	44
Figura 12.C.	Concentração de glutamina na camada serosa e no tecido intestinal em meio com 40 mM de glutamina nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	44
Figura 12.D.	Concentração de glutamina na camada serosa e no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	45

Figura 13.A.	Concentração de glutamina na somatória da camada serosa com tecido intestinal e na camada mucosa, em meio com 10 mM de glutamina, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos....	46
Figura 13.B.	Concentração de glutamina na somatória da camada serosa com tecido intestinal e na camada mucosa, em meio com 20 mM de glutamina, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos....	46
Figura 13.C.	Concentração de glutamina na somatória da camada serosa com tecido intestinal e na camada mucosa, em meio com 40 mM de glutamina, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	47
Figura 13.D.	Concentração de glutamina na somatória da camada serosa com tecido intestinal e na camada mucosa, em meio com 50 mM de glutamina, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	47
Figura 14.	Histologia jejunal submetida à HE de animais saudáveis (A), incubados por 120 minutos (B), animais endotoxêmicos (C) e endotoxêmicos incubados por 120 minutos (D).....	49
Figura 15.	Histologia jejunal submetida a picosirios de animais saudáveis (A), incubados por 120 minutos (B), animais endotoxêmicos (C) e endotoxêmicos incubados por 120 minutos (D).....	50
Figura 16.A.	Concentração de glutamina na camada serosa em meio com 50 mM de glutamina, com e sem glicose, nos camundongos controle e tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	51
Figura 16.B.	Concentração de glutamina na camada serosa em meio com 50 mM de glutamina com e sem glicose, em animais submetidos à endotoxemia nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos	52
Figura 17.A.	Concentração de glutamina na camada serosa em meio com 50 mM de glutamina em camundongos controle e submetidos à endotoxemia, na presença de glicose, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	53
Figura 17.B.	Concentração de glutamina na camada serosa em meio com 50 mM de glutamina em camundongos controle e submetidos à endotoxemia na ausência de glicose, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	53

Figura 18.A.	Concentração de glutamina no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina com e sem glicose em camundongos controle nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	54
Figura 18.B.	Concentração de glutamina no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina com e sem glicose em camundongos submetidos à endotoxemia nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	55
Figura 19.A.	Concentração de glutamina no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina com glicose em camundongos controle e submetidos à endotoxemia nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	56
Figura 19.B.	Concentração de glutamina no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina sem glicose em camundongos controle e submetidos à endotoxemia nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	56
Figura 20.A.	Concentração de glutamina na camada serosa e no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina na presença de glicose, nos camundongos submetidos à endotoxemia, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	57
Figura 20.B.	Concentração de glutamina na camada serosa e no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina na ausência de glicose, nos camundongos submetidos à endotoxemia, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Taxa de sobrevivência de camundongos após 48 horas de injeção de LPS	30
Tabela 2.	Concentração de glutamina na camada serosa nos meios com 10, 20, 40 e 50 mM de glutamina nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	35
Tabela 3.	Concentração de glutamina no tecido intestinal nos meios com 10, 20, 40 e 50 mM de glutamina nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	38
Tabela 4.	Concentração de glutamina na camada mucosa nos meios com 10, 20, 40 e 50 mM de glutamina nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.....	42
Tabela 5.	Massa corporal dos camundongos controle e endotoxêmicos nos tempos 0, 24 e 48 horas.....	48
Tabela 6.	Consumo de ração dos camundongos controle e submetidos à endotoxemia em 24 e 48 horas após injeção de LPS.....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Sistemas de transporte de aminoácidos intestinais.....	08
Quadro 2.	Crterios diagnsticos de sepse.....	18

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	04
2.1 Objetivo geral.....	04
2.2 Objetivos específicos.....	04
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	05
3.1 Glutamina.....	05
3.1.1 História da glutamina.....	05
3.1.2 Absorção intestinal de glutamina	06
3.1.3 Bioquímica e metabolismo da glutamina.....	10
3.1.4 Glutamina nos tecidos e no sistema imune.....	14
3.2 Sepse.....	16
3.2.1 Definições e epidemiologia da sepse.....	16
3.2.2 Metabolismo da glutamina na sepse	20
3.3 Suplementação de glutamina.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Animais.....	26
4.2 Técnica de eversão intestinal.....	26
4.3 Tempos de incubação das frações intestinais.....	28
4.4 Concentrações de L-[¹⁴ C(U)]-glutamina e L-glutamina.....	29
4.5 Cálculo da concentração de glutamina nas camadas serosa, mucosa e tecido intestinal.....	29
4.6 Radioatividade.....	30
4.7 Animais submetidos à endotoxemia.....	30
4.8 Histologia do tecido intestinal.....	31
4.9 Análise estatística.....	31

5. RESULTADOS.....	32
5.1 Concentração de glutamina na camada serosa nos meios com 10, 20, 40 e 50 mM de glutamina.....	32
5.2 Concentração de glutamina no tecido intestinal nos meios com 10, 20, 40 e 50 mM de glutamina.....	35
5.3 Concentração de glutamina na camada mucosa nos meios com 10, 20, 40 e 50 mM de glutamina.....	39
5.4 Comparação entre a concentração de glutamina na camada serosa e no tecido intestinal.....	42
5.5 Comparação entre a concentração de glutamina na camada mucosa e a somatória das concentrações de glutamina na camada serosa e no tecido intestinal..	45
5.6 Massa corporal dos camundongos controles e submetidos à endotoxemia por LPS.....	48
5.7 Consumo de ração dos camundongos controles e submetidos à endotoxemia por LPS.....	48
5.8 Histologia do tecido intestinal.....	49
5.9 Concentração de glutamina na camada serosa de animais controles e submetidos à endotoxemia em meio com 50 mM de L-glutamina.....	51
5.10 Concentração de glutamina no tecido intestinal de animais controles e submetidos à endotoxemia em meio com 50 mM de L-glutamina.....	54
5.11 Comparação entre a concentração de glutamina na camada serosa e no tecido intestinal de camundongos submetidos à endotoxemia.....	57
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÃO.....	69
8. PERSPECTIVAS.....	70
9. REFERÊNCIAS.....	71
10. ANEXO.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μCi	Microcure
AP-1	<i>Activating protein 1</i> Ativadores de proteínas 1
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i> Proteína quinase 1 reguladora de sinais de apoptose
ASS	Argininosuccinato sintase
ATP	Trifosfato de adenosina
¹⁴C	Carbono de número de massa 14
CLP	<i>Cecal ligation and puncture</i> Ligação e punção cecal
NaCl	Cloreto de sódio
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> Ácido desoxirribonucléico
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i> Proteína quinase regulada por sinal extracelular
FADH	Flavina adenina dinucleotídio ligada ao hidrogênio
FMO	Falência múltipla de órgãos
GABA	<i>Gama-aminobutyric acid</i> Ácido gama-aminobutírico
GFAT	<i>Glutamine:fructose-6-phosphato amidotransferase</i> Glutamina-frutose-6-fosfato amidotransferase

GLN	Glutamina
GSH	Glutathiona
GSK3β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i> Enzima glicogênio sintase quinase 3 beta
H⁺	Hidrogênio
HE	Hematoxilina-eosina
HIV	<i>Human immunodeficiency vírus</i> Vírus da imunodeficiência humana
HMGB-1	<i>High-mobility group box 1</i> Proteína de alta mobilidade box-1
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> Cromatografia líquida de alta eficiência
HSF-1	<i>Heat shock factor</i> Fator de choque térmico 1
HSP72	<i>72-kDa heat shock protein</i> Proteínas de choque térmico de 72 kDa
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthetase</i> Óxido nítrico sintetase induzível
JNK/SAPK	<i>c-Jun-Nterminal kinase/SAPK, stress-activated protein kinase</i> N terminal quinase c-Jun e a proteína quinase ativada por estresse
kDa	Kilodaltons
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> Proteína ativada por mitógeno quinase

mM	<i>Milimolar</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamicine</i> Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
Na⁺	Sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio ligada ao íon hidrogênio
NCHS	<i>National Center for Health Statistics</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> Fator nuclear κB
NH₄⁺	Amônio
NOS	<i>Nitric oxide synthetase</i> Óxido nítrico sintetase
O-GlcNac	O-linked β-N-acetylglucosamine N-Ac-glicosamina
OGT	<i>Uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide β-N-acetylglusaminyl transferase</i> Enzima uridina difosfato-N-acetilglicosamina: peptídeo β-N-acetilglicosaminil transferase
p38^{MAPK}	<i>p-38 mitogen-activated protein kinase</i> Proteína quinase ativada por mitógeno p38
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PgE₂	Prostaglandina E2
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> Ácido ribonucléico
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro

RNA_t	Ácido ribonucleico transportador
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SGLGT-1	<i>Sodium-glucose transport protein 1</i> Transporte de glicose dependente de sódio 1
TLR4	<i>toll-like-receptor-4</i> Receptor do tipo Toll 4
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-alfa</i> Fator de necrose tumoral-alfa
UDP-<i>N</i>-acetilglicosamina	Uridina difosfato <i>N</i> -acetilglicosamina
UTI	Unidade de terapia intensiva
UTP	Uridina trifosfato

1. INTRODUÇÃO

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido muscular, sendo responsável por diversos processos, incluindo a proliferação celular (CURI *et al.*, 2005a), o balanço ácido-básico, o transporte intertecidual de amônia (NEWSHOLME *et al.*, 2003b) e a síntese de antioxidantes (CRUZAT *et al.*, 2007). A glutamina tem importante papel, promovendo e mantendo funções de diversos órgãos e células, como rins, intestino, fígado, coração, neurônios, linfócitos, macrófagos, neutrófilos, células- β pancreáticas e adipócitos brancos (CURI *et al.*, 2005a; CURI *et al.*, 2005b). Além disso, a glutamina regula a expressão de diversos genes e modula vias de sinalização intracelulares, como a do fator nuclear κB (*nuclear factor kappa B* - NF- κB), da proteína quinase Akt e da proteína ativada por mitógeno quinase (*mitogen activated protein kinase* - MAPK) (SINGLETON, BECKEY, WISCHMEYER, 2005; CURI *et al.*, 2005b).

Nutricionalmente, a glutamina é classificada como um aminoácido não essencial, pois pode ser sintetizada pelo organismo, de acordo com a necessidade (NEWSHOLME *et al.*, 2003a). Estudos, contudo, demonstram que em situações catabólicas, tais como jejum prolongado (HANKARD, HAYMOND, DARMAUN, 1997), cirurgias (FLÄRING *et al.*, 2003), dengue (KLASSEN *et al.*, 2000), sepse (LIANG *et al.*, 2009) e exercício físico de alta intensidade e/ou prolongado (CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009), a disponibilidade de glutamina torna-se reduzida. A menor disponibilidade de glutamina ocorre tanto pelo aumento de seu consumo por células, tais como as do sistema imune e renal, quanto pela redução de sua síntese e liberação pela musculatura esquelética (NEWSHOLME *et al.*, 2003a). Conclui-se então que uma variedade de funções celulares pode ser influenciada pela disponibilidade de glutamina, incluindo maior apoptose de células, estresse oxidativo, agravamento do estado inflamatório, menor síntese e maior degradação de proteínas (FLÄRING *et al.*, 2003; CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009).

Via fluxo interórgãos de substratos, a manutenção das concentrações de glutamina no organismo, por meio da sua suplementação, contribui para a homeostasia celular (WERNERMAN, 2008; ROTH, 2008). Em condições de deficiência de glutamina, sobretudo em pacientes criticamente enfermos, a suplementação de glutamina tem reduzido as complicações clínicas destes indivíduos (WISCHMEYER *et al.*, 2001; ZIEGLER *et al.*, 2005; DECHELOTTE *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2007). No entanto, as vias e as formas de administração ainda são discutíveis.

Agudamente, a suplementação com glutamina aumenta a glutaminemia (ROGERO *et al.*, 2002), enquanto que, cronicamente, verifica-se maior concentração de glutamina em tecidos, tais como o muscular e o hepático (ROGERO *et al.*, 2004). Em estudos de estresse metabólico, tais como o exercício físico, têm-se verificado que a suplementação crônica com L-glutamina, associada à L-alanina, ambas na forma livre, ou ao dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, promove maior concentração de glutamina nos tecidos muscular e no hepático, elevando a concentração tecidual do antioxidante glutathiona (GSH) (CRUZAT *et al.*, 2007; CRUZAT, TIRAPEGUI, 2009). Posteriormente, observou-se que a mesma suplementação com glutamina atenuou a liberação de creatina quinase e citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral-alfa (*tumor necrosis factor-alfa* - TNF- α) e a prostaglandina E2 (PgE₂) (CRUZAT, ROGERO, TIRAPEGUI, 2010). Entretanto, não são conhecidos se esses efeitos são decorrentes diretos da suplementação oral com glutamina ou da redução de sua captação a partir da membrana basolateral de enterócitos.

Com intuito de investigar o metabolismo da glutamina, estudos utilizando diferentes marcações no aminoácido (isótopos ou radioisótopos) têm sido realizados (CROSET *et al.*, 2001; BOELEN *et al.*, 2005; BOELEN *et al.*, 2006; LIGTHART-MELIS *et al.*, 2007, MARTIN *et al.*, 2007). Nestes, a via enteral tem demonstrado contribuir mais efetivamente na síntese renal de arginina *de novo* proveniente da suplementação de [2-¹⁵N]-glutamina do que da suplementação com o dipeptídeo L-alanina-[2-¹⁵N]-glutamina via parenteral (BOELEN *et al.*, 2006; LIGTHART-MELIS *et al.*, 2007), fato que merece maior investigação.

Neste contexto, atenção especial tem sido dada à identificação de transportadores intestinais específicos para glutamina e à dependência ou não de íons como sódio e cloreto (BROER, 2008; TALUKDER *et al.*, 2008). Além do mais, pesquisas avançam nos estudos de transporte intestinal em condições patológicas, como em enteropatias (RAY *et al.*, 2003) e na sepse (NIU *et al.*, 2011). No entanto, apesar da glutamina atravessar a borda em escova, parte deste aminoácido proveniente da alimentação e/ou da suplementação é consumida pelas próprias células intestinais, não alcançando a corrente sanguínea, uma vez que a glutamina serve como substrato para síntese e manutenção dos enterócitos (ADIBI, 2003).

O estudo da cinética na absorção intestinal de glutamina mostra em qual dose do aminoácido a absorção é maior em relação à retenção tecidual. Na endotoxemia, verifica-se quais são as alterações na concentração de glutamina absorvida, decorrentes da sepse, e se a presença de glicose no lúmen interfere no transporte da glutamina no intestino de animais submetidos a lipopolissacarídeo (LPS). Estas informações facilitam decisões relacionadas à via a ser utilizada - oral, enteral ou parenteral -; aos objetivos da suplementação, tais como

restaurar a função intestinal ou alcançar a corrente sanguínea para ser metabolizada por outras células e tecidos; e, ainda, se é necessária oferta de glicose concomitantemente à suplementação de glutamina. Nesse sentido, o presente trabalho investigou a cinética na absorção intestinal da suplementação de [^{14}C]-glutamina nos camundongos em condições basais e na endotoxemia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem por objetivo investigar a cinética na absorção intestinal de [^{14}C]-glutamina em camundongos saudáveis e submetidos à sepse por endotoxemia.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a cinética da absorção intestinal de diferentes concentrações de [^{14}C]-glutamina em camundongos saudáveis.
- Avaliar a cinética da absorção intestinal de [^{14}C]-glutamina em camundongos submetidos à endotoxemia.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Glutamina

3.1.1 História da glutamina

A história da glutamina tem início em 1873, quando Hlasietz e Habermann sugeriram que a amônia encontrada em hidrolisados proteicos era proveniente de glutamina e asparagina. Em 1932, Damadaram isolou a glutamina deste hidrolisado proteico e, em 1935, Krebs descreveu o metabolismo das enzimas que catalisam e sintetizam a glutamina, glutaminase e glutamina sintetase, respectivamente (CURI, 2000). No mesmo ano (1935), Krebs também identificou duas diferentes isoformas da enzima glutaminase, tipo “hepática” e tipo “cerebral”, sendo que esta última hoje é conhecida como “glutaminase renal” (BROSNAN, 2001). Eagle, em 1959, descreveu que a presença da glutamina é essencial em estudos de cultura de células; além disso, evidenciou que a glutamina é convertida em ácido glutâmico, ácido aspártico, asparagina e prolina e, em menor proporção, em serina e alanina. E, ainda, que o esqueleto de carbono proveniente da glutamina é utilizado para síntese de purinas e pirimidinas, enquanto o grupo amino contribui para a formação de mais da metade das bases nitrogenadas (EAGLE, 1959).

Estudos dos últimos 60 anos têm demonstrado que a glutamina é um aminoácido crucial para os processos metabólicos e para o crescimento de células do sistema imune, como linfócitos, macrófagos, neutrófilos (NEWSHOLME *et al.*, 1989; CURI *et al.*, 1997). Foi evidenciado ainda que a glutamina era proveniente das proteínas ou da conversão de outros aminoácidos e que o organismo possui mecanismos endógenos de síntese, efluxo, transporte e utilização de glutamina, o que a designava como um aminoácido “não essencial” (LACEY; WILMORE, 1990). No entanto, estudos mais recentes demonstraram que, em condições patológicas, o estoque de glutamina e a capacidade de síntese não são suficientes para atender às necessidades do organismo. Tal fato se intensifica quando o indivíduo não é capaz de digerir e/ou absorver os nutrientes da dieta através do trato gastrointestinal, quando estiver em jejum prolongado ou quando receber dietas por via parenteral sem a presença de glutamina. Por isso, atualmente a glutamina é conhecida como um aminoácido “condicionalmente essencial” (LACEY; WILMORE, 1990).

Pesquisas têm indicado diminuição da morbidade e da mortalidade com a suplementação de glutamina em pacientes críticos (ZIEGLER *et al.*, 1992; GRIFFITHS *et al.*, 1997; WISCHMEYER *et al.*, 2001; GOETERS *et al.*, 2002); no entanto, outros trabalhos não demonstraram mesmo efeito (GORE, WOLFE, 2002; HALL *et al.*; 2003; SCHULMAN *et al.*, 2005). Tais contradições são justificadas por diferentes metodologias, tais como doses, vias de administração e seleção de pacientes, além de que a suplementação de glutamina aparentemente não apresenta nenhum efeito colateral (NOVAK *et al.*, 2002; TSUBUKU *et al.*, 2004; WATFORD, 2008).

3.1.2 Absorção intestinal de glutamina

Mediante a absorção de aminoácidos e pequenos peptídeos oriundos da dieta, animais, dentre os quais o homem, satisfazem suas necessidades nutricionais proteicas. O processo envolve a digestão de proteínas no lúmen intestinal para gerar produtos menores, que são absorvidos pelas células intestinas (ADIBI, 2003; ROGERO; TIRAPEGUI, 2003). Os produtos finais da digestão das proteínas da dieta são uma mistura de aminoácidos livres, (40%) dipeptídeos e tripeptídeos (60%) (ADIBI, 2003). Na **Figura 1** observa-se a estrutura básica da célula intestinal (enterócito).

Figura 1. Organização básica da célula intestinal.

Fonte: adaptado de JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008.

Antigamente, acreditava-se que as proteínas eram completamente hidrolisadas no lúmen intestinal e então absorvidas como aminoácidos em sua forma livre. Há mais de 40 anos estudos revelaram que o principal produto da digestão eram dipeptídeos e tripeptídeos e não aminoácidos. Foi identificado então o transportador exclusivo de oligopeptídeos na borda em escova do intestino delgado, o Pept-1- H^+ dependente (FEI *et al.*, 1994). Na membrana basolateral encontra-se outro transportador de pequenos peptídeos dependente de sódio, responsável pelo transporte dos peptídeos até a corrente sanguínea (ADIBI, 2003). Em situações catabólicas, como na presença de LPS de bactérias, pode haver redução na expressão do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) dos Pept-1 e na síntese dos Pept-1, alterando assim a capacidade absorptiva dos enterócitos (SHU *et al.*, 2002).

O transporte de peptídeos e aminoácidos da borda em escova até a membrana basolateral ocorre através de transporte ativo ou diretamente através da membrana dos enterócitos ou ainda por endocitose. É chamado de transporte transcelular, já que atravessa o interior do enterócito (GILBERT; WONG; WEBB, 2008). O transporte entre as células intestinais é denominado paracelular ou intercelular (PAPENHEIMER, 2001) (**Figura 2**).

Figura 2. Transporte de aminoácidos e peptídeos na célula intestinal.

Fonte: adaptado de GILBERT; WONG; WEBB, 2008.

Os aminoácidos na forma livre atravessam a borda em escova dos enterócitos através dos sistemas de transporte específicos para cada grupo ou aminoácido. Alguns exemplos são os sistemas de transportes chamados L, Y⁺, Y⁺L, b⁰⁺, A, ASC, B⁰, B⁰⁺ e X_{AG}⁻ (BROER, 2008). Cada sistema se diferencia pela sua funcionalidade e tem especificidade para determinados substratos aminoacídicos ou mesmos tipos de aminoácidos com diferentes trocas iônicas (**Quadro 1**).

Quadro 1. Sistemas de transporte de aminoácidos intestinais.

Sistema	Aminoácidos Alvo	Íons cotransporte	Afinidade	Localização
ASC	Ala, Ser, Cys, Thr, Gln	Na ⁺ (A)	Alta	MA
B⁰⁺	Aas Neutros e Básicos, β-Ala	Na ⁺ (S), Cl ⁻ (S)	Alta	MA
B⁰	Aas Neutros	Na ⁺ (S)	Baixa	MA
b⁰⁺	Arg, Lys, Ornit, Cistina	Na ⁺ (A), Cl ⁻ (A)	Alta	MA
IMINO	Pro, Hidroxi-Pro	Na ⁺ e Cl ⁻ (S)	Média	MA
PAT	Pro, Gli, Ala, GABA, β-Ala	H ⁺ (S)	Baixa	MA
X_{AG}⁻	Glu e Asp	Na ⁺ (S), H ⁺ (S), K ⁺ (A)	Alta	MA
L	Aas Neutros, exceto Pro	Na ⁺ (A), Cl ⁻ (A)	Média	MB
T	Phe, Tyr, Trp	H ⁺ (U)	Baixa	MB
Y⁺L	Lys, Arg, Gln, Met, His, Leu, Ala, Cys	Na ⁺ (S) junto com Aas Neutros	Alta	MB
A	Gly, Pro, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, His, Met	Na ⁺ (S)	Média	MA e MB
X_c⁻	Glu, Cistina	Na ⁺ (A), H ⁺ (A), K ⁺ (A)	Alta	MA e MB
Y⁺	Arg, Lys, Ornit, His	Na ⁺ (U), H ⁺ (U), K ⁺ (U)	Média	MA e MB

Abreviaturas: A = Antiporte, S = Simporte, U = Uniporte, MA = Membrana apical, MB = Membrana basolateral.

Fonte: adaptado de BROER, 2008.

A importância em definir transportadores específicos para glutamina se dá na medida que estes são afetados pela presença ou não de íons no meio. E, ainda, permite o estudo de absorção de glutamina em diferentes condições patológicas, tais como o realizado por Ray e colaboradores (2003), na enterectomia, e por Niu e colaboradores (2011), na seps. A passagem de

glutamina através do intestino é conduzida principalmente (aproximadamente 90%) por transportadores dependentes de sódio (Na^+), como os sistemas B^{0+} , B^0 , ASCT2 (RAY *et al.*, 2003).

Dada a relevância da glutamina, sobretudo em células intestinais, atenção especial tem sido oferecida nos estudos, sendo que em 2008 foi identificado, caracterizado e clonado um co-transportador intestinal para glutamina, nas vilosidades absorptivas em células intestinais de mamíferos, o $\text{B}^0\text{AT1}$ Na-dependente (TALUKDER *et al.*, 2008). Em outro estudo, Niu e colaboradores (2011) verificaram, em condições basais, que a contribuição dos transportadores A, B^{0+} , B^0 foi 12%, 25% e 63%, respectivamente, na absorção de glutamina. Neste mesmo estudo, em ratos submetidos à sepse, observou-se que tais transportadores tiveram aumento em sua expressão imediatamente após infecção (pico de 2 horas pós-LPS) e subsequente redução nos transportadores após 12 horas (NIU *et al.*, 2011).

Apesar de a glutamina atravessar a borda em escova, parte deste aminoácido, proveniente da alimentação e/ou da suplementação, é consumida pelas próprias células intestinais, não alcançando a corrente sanguínea, uma vez que a glutamina serve como substrato para síntese e manutenção dos enterócitos (ADIBI, 2003). A **Figura 3** apresenta alguns prováveis destinos da glutamina oriunda do lúmen intestinal.

ALA = Alanina, GLN = Glutamina, DIP = Dipeptídeo alanil-glutamina, Trans AA = Transportador específico de aminoácidos, PepT-1 = Transportador de pequenos peptídeos 1.

Figura 3. Transporte e destino a partir do lúmen intestinal de glutamina, alanina e alanil-glutamina.

3.1.3 Bioquímica e metabolismo da glutamina

A glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) é um L- α -aminoácido com peso molecular de 146,15 kilodaltons (kDa), que pode ser sintetizada de forma generalizada nos tecidos do organismo via enzima glutamina sintetase (CURI, 2000; NEWSHOLME *et al.*, 2003b). Fazem parte de sua composição química: carbono (41,09%), oxigênio (32,84%), nitrogênio (19,17%) e hidrogênio (6,90%) (LACEY; WILMORE, 1990; CURI, 2000). De acordo com seu grupamento R, ou seja, sua cadeia lateral, a glutamina é classificada como não carregada, mas é polar, o que lhe dá mais características hidrofílicas, sendo facilmente hidrolisada por ácidos ou bases (ROGERO; TIRAPEGUI, 2003). A glutamina é estruturalmente similar ao glutamato, contendo 5 carbonos em sua composição. No entanto, o glutamato tem um grupo carboxílico que substitui o nitrogênio amino da glutamina, o que lhe confere uma carga negativa e, com isso, a glutamina e o glutamato têm diferentes efeitos nas células e são dependentes de transportadores específicos nas membranas celulares (**Figura 4**) (NEU; SHWNOY; CHAKRABARTI, 1996).

GLUTAMINA

GLUTAMATO

Figura 4. Estrutura química de glutamina e glutamato.

Fonte: adaptado de NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996.

A glutamina está envolvida com diversos processos metabólicos, sendo que um dos principais é o ciclo do ácido cítrico (NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996). A glutamina, via glutamato, é convertida à alfa-cetoglutarato, componente do ciclo do ácido cítrico, participando assim do fornecimento de energia para enterócitos e linfócitos, dentre outras células (WIREN; MAGNUSSON; LARSSON, 1998; CURI *et al.*, 1999). Além disso, o glutamato formado a partir da deaminação de glutamina é precursor de ácido gama-aminobutírico (*gama-aminobutyric acid* - GABA), inibidor de neurotransmissores (LIANG; CARLSON; COULTER, 2006). A prolina, componente de colágeno e tecidos conectivos, também é produzida a partir da ciclização do glutamato, assim como a arginina, responsável pela produção de ureia e creatina fosfato (WATFORD, 2008). A transaminação de glutamina participa da transferência de amônia entre os tecidos (CURTHOYS; WATFORD, 1995). O

grupo amino da glutamina é utilizado para síntese de purinas e pirimidinas precursoras de ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid* – DNA) e ácido ribonucleico (*ribonucleic acid* – RNA) (BOZA *et al.*, 2000a). Metabólitos da glutamina são utilizados para formação de hexosaminas, responsáveis por manter a integridade e a função das mucosas (HAMIEL *et al.*, 2009). A enzima antioxidante glutathiona é composta por glutamato (derivado da glutamina), cistina e glicina (**Figura 5**) (NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996; ROTH *et al.*, 2002).

Figura 5. Interações bioquímicas de glutamina e glutamato.

Fonte: adaptado de NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996.

As enzimas envolvidas na interconversão de glutamina e glutamato são glutaminase e glutamina sintetase. Ambas são expressas na maioria dos tecidos. A glutaminase catalisa a hidrólise de glutamina em glutamato e amônia, enquanto a glutamina sintetase catalisa a síntese de glutamina a partir de glutamato e amônia (**Figura 6**) (KREBS, 1935; NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996). Estas enzimas se diferenciam na localização intracelular. A

glutamina sintetase é principalmente encontrada no citosol, enquanto a glutaminase na forma ativa é encontrada na mitocôndria. Esta localização está de acordo com suas funções, sendo que a glutaminase catalisa a utilização de glutamina como fonte de energia e a glutamina sintetase produz glutamina para síntese de nucleotídeos e proteínas citosólicas. Os principais consumidores de glutamina são intestino, linfócitos e rins, os quais têm alta atividade de glutaminase (LABOW; SOUBA; ABCOUWER, 2001). Já os principais produtores de glutamina são cérebro, músculo esquelético e pulmão, contendo alta atividade da enzima glutamina sintetase. O fígado é tanto consumidor como produtor de glutamina, conforme a necessidade do organismo (NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996; ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996).

Figura 6. Reações catalisadas pelas enzimas glutaminase e glutamina sintetase.

Fonte: adaptado de NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996.

Quando comparada a qualquer outro aminoácido em condições basais, a glutamina é o aminoácido mais abundante do organismo. Contudo, sua concentração pode variar de acordo com órgão ou meio. No meio extracelular, por exemplo, a concentração de glutamina é de 0,5 a 0,7 milimolar (mM), o que corresponde a 20% do total dos aminoácidos (NEWSHOLME *et al.*, 2003b). Já no meio intracelular, varia entre 2 e 20 mM, dependendo do tipo de célula (NEWSHOLME *et al.*, 2003a). A glutamina também é o aminoácido mais abundante no tecido muscular, correspondendo de 40 a 60% do total de aminoácidos, e sua concentração está entre 5,2 e 5,7 mM, enquanto no cérebro está entre 6 e 11 mM e nos hepatócitos de 5 a 8 mM. Nos enterócitos, a quantidade de glutamina depende do estado de alimentação, já que em períodos pós-prandiais a concentração alcança 6 mM e no jejum está em torno de 0,5 mM (CURI *et al.*, 2005b).

3.1.4 Glutamina nos tecidos e no sistema imune

A glutamina tem diferentes funções dependendo do tipo de célula. O fígado é um órgão importante na manutenção da glutaminemia, uma vez que sintetiza glutamina a partir de glutamato e amônia (HAUSSINGER, 1990), processo também responsável pela remoção da amônia do organismo, favorecendo o equilíbrio ácido-base (WELBOURNE; JOSHI, 1990). Quillard e colaboradores. (1996) demonstraram, em hepatócitos, que a glutamina aumenta a enzima argininosuccinato sintase (ASS), responsável pelo ciclo de ureia e amônia. Já a presença de glutaminase, enzima que degrada a glutamina, proporciona que a mesma sirva como fonte de nitrogênio e aspartato para a síntese de nucleotídeos e seja utilizada como substrato energético para as células que se dividem rapidamente, como enterócitos e linfócitos, sobretudo em condições patológicas como na endotoxemia (CURI *et al.*, 1997). Em hepatócitos, a glutamina aumenta a expressão e a atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima chave na gliconeogênese (LAVOINNE *et al.*, 1996). Isso demonstra o papel da glutamina na manutenção de glicemia, sobretudo durante o exercício associado ao jejum (BORBA-MURAD *et al.*, 1998). Em situações de estresse, tal como a sepse, o fígado passa de órgão liberador para órgão consumidor de glutamina, a fim de restaurar o balanço no plasma e nos tecidos extra-hepáticos (INOUE; PACITTI; SOUBA, 1993).

Ainda em hepatócitos, a glutamina modula as vias envolvidas com apoptose celular, tais como a proteína quinase 1 reguladora de sinais de apoptose (*apoptosis signal-regulating*

kinase 1 - ASK1), a N terminal quinase c-Jun e a proteína quinase ativada por estresse (*c-Jun-Nterminal kinase/SAPK, stress-activated protein kinase* - JNK/SAPK) (YOUNG-GYU *et al.*, 2001). A glutamina é transportada para o fígado através do sistema de transporte “N” dependente de sódio, o que induz a hidratação dos hepatócitos e ativa vias de sinalização, como a das MAPK. Neste sentido, a glutamina exerce ação antiproteolítica, através da ativação da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (*mitogen activate protein kinase p38* - p38^{MAPK}) e estimula a excreção biliar via proteína quinase regulada por sinal extracelular (*extracellular signal-regulated protein kinase* - ERK) (HAUSSINGER; GRAF; WEIERGRABER, 2001).

Nos rins, a degradação de glutamina exerce a função de eliminar os íons hidrogênio (H^+), sob a forma de amônio (NH_4^+), a fim de reestabelecer o pH sanguíneo. A utilização da glutamina nos rins não envolve consumo de energia, pelo contrário, fornece energia diretamente através de seu metabolismo oxidativo ou ainda por ser convertida em glicose (NEWSHOLME *et al.*, 2003b). Além disso, Young-Gyu e colaboradores (2001) verificaram que em células renais a glutaminil-tRNA sintetase, enzima dependente de glutamina, atua na proliferação celular e na modulação da apoptose.

As funções da glutamina no sistema imune se dão desde a proliferação de células T, à diferenciação de linfócitos B, fagocitose de macrófagos, produção e diminuição de apoptose de neutrófilos, até a modulação de citocinas (NEWSHOLME; CRABTREE; ARDAWI, 1985; CURI *et al.*, 1997; NEWSHOLME *et al.*, 2003a; PITHON-CURI *et al.*, 2003). Em experimento realizado em neutrófilos estimulados por LPS em meio de cultura, a produção do TNF- α é reduzida pela presença de glutamina, acompanhada do aumento na expressão das proteínas de choque térmico de 72 kDa (72-kDa *heat shock protein* - HSP72) (WISCHMEYER *et al.*, 2003). Tais efeitos corroboram estudos do próprio Wischemeyer (2002), que demonstraram que tanto *in vitro* quanto *in vivo* a glutamina aumenta a expressão das HSP. Além disso, o glutamato proveniente da degradação da glutamina aumenta as defesas antioxidantes das células, através da síntese de GSH (NEWSHOLME *et al.*, 2003a). Tais fatos podem reduzir danos nos tecidos, disfunções em múltiplos órgãos e morte induzida pela sepse (CURI *et al.*, 2005b).

O trato gastrointestinal é o principal órgão de utilização de glutamina, sendo quantitativamente o mais importante combustível para as células do intestino (SOUBA, 1993). A conversão de glutamina em alanina nos enterócitos serve como substrato metabólico para a nicotinamida adenina dinucleotídio ligada ao íon hidrogênio (NADH), e flavina adenina dinucleotídio ligada ao hidrogênio (FADH), que doam elétrons para a fosforilação oxidativa, a fim de gerar trifosfato de adenosina (ATP), enquanto a alanina é transportada

para o fígado, onde é convertida em glicose (NEWSHOLME *et al.*, 2003a). Em células intestinais, Coeffier e colaboradores (2003) verificaram que a glutamina estimula a síntese proteica e atenua a proteólise dependente de ubiquitinas. Além disso, Rhoads e colaboradores (1997) demonstraram que este aminoácido potencializa fatores de proliferação e reparação celular, através do aumento da transcrição de genes ativadores de proteínas 1 (*activating protein 1* - AP-1) e níveis de RNAm c-Jun.

Todos os órgãos e as células do sistema imune citados acima dependem da manutenção da concentração de glutamina plasmática. O músculo esquelético é considerado o sítio mais relevante na produção de glutamina. Apesar de no músculo a atividade da glutamina sintetase ser baixa em comparação com outros tecidos como cérebro, fígado e pulmão, a contribuição é alta devido ao músculo representar aproximadamente 40% da massa corporal total (NEWSHOLME *et al.*, 2003b). A diminuição no volume da massa muscular, que ocorre em situações como na sepse (LIANG *et al.*, 2009), reduz a liberação de glutamina e a capacidade funcional orgânica, contribuindo para maior morbidade e mortalidade de indivíduos (TISDALE, 2005). Desta forma, embora a glutamina seja sintetizada pelo organismo, sua necessidade nutricional depende de uma condição fisiológica, o que, como dito, a classifica como um aminoácido condicionalmente essencial. Cabe lembrar que além da sepse (LIANG *et al.*, 2009), a disponibilidade de glutamina é reduzida em outras situações catabólicas, tais como jejum prolongado (HANKARD; HAYMOND; DARMAUN, 1997), cirurgias (FLÄRING *et al.*, 2003), dengue (KLASSEN *et al.*, 2000) e exercícios físicos de alta intensidade e/ou prolongados (CRUZAT; TIRAPEGUI, 2009).

3.2 Sepse

3.2.1 Definições e epidemiologia da sepse

A sepse é definida como a presença de infecção acompanhada por síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (BONE *et al.*, 1992). Na **Figura 7**, pode-se verificar uma ilustração da relação entre infecção, SIRS e sepse.

Figura 7. Relação entre infecção, SIRS e sepse.

Fonte: adaptado de BONE *et al.*, 1992.

Em 1992, foi publicado o consenso na definição de sepse, o qual inclui a presença de infecção (ou suspeita) e de outros dois (ou mais) sintomas: (1) temperatura corporal maior do que 38°C ou menor do que 36°C, (2) frequência cardíaca de mais de 90 batimentos por minuto, (3) frequência respiratória maior que 20 inspirações por minuto e (4) contagem total de leucócitos maior do que 12.000 células por microlitro (μL) ou menor do que 4.000/ μL ou ainda mais de 10% de células imaturas (BONE *et al.*, 1992). Em 2006, especialistas das sociedades de terapia intensiva norte-americana e europeia propuseram novos critérios diagnósticos de sepse, que incluem presença de infecção e “alguns” critérios de SIRS (**Quadro 2**), que devem ser avaliados por uma equipe multidisciplinar de especialistas para adequado diagnóstico (NGUYEN *et al.*, 2006).

Quadro 2. Critérios diagnósticos de sepse.

Infecção (ou suspeita) e alguns dos critérios abaixo	
Variáveis gerais	Febre (temperatura corporal maior do que 38°C)
	Hipotermia (temperatura corporal menor do que 36°C)
	Frequência cardíaca de mais de 90 bpm ou acima de 2 DP do valor normal
	Taquipneia (frequência respiratória maior do que 20 inspirações/min)
	Desorientação mental
	Edema significativo ou balanço de fluídos positivo (>20 ml/kg em 24 horas)
	Hiperglicemia (>120 mg/dL) na ausência de diabetes
Variáveis inflamatórias	Leucocitose (>12.000/mm ³)
	Leucopenia (<4.000/mm ³)
	Contagem normal com 10% de células imaturas
	Proteína C-reativa no plasma maior do que 2 DP acima do valor normal
	Procalcitonina no plasma maior do que 2 DP acima do valor normal
Variáveis hemodinâmicas	Hipotensão arterial
	Saturação venosa de oxigênio >70%
	Índice cardíaco > 3,5 L/min/m ²
Disfunção de órgãos	Hipóxia arterial
	Oliguria aguda
	Creatinina maior do que 0,5 mg/dL
	Anormalidades de coagulação
	Oclusão intestinal
	Trombocitopenia
	Hiperbilirrubinemia
Perfusão tecidual	Hiperlactatemia
	Queda de cabelos

Bpm: batimentos por minuto; DP: desvio padrão

Fonte: adaptado de NGUYEN *et al.*, 2006.

Sepse severa é definida como a presença de sepsse acrescentada de uma ou mais disfunções nos órgãos, como injúria pulmonar aguda, falência renal, hepática ou cardíaca e hipoperfusão com acidose láctica (LEVY *et al.*, 2003). O choque séptico inclui hipotensão induzida pela sepsse (pressão arterial sistólica menor do que 90 mm Hg) e falência cardíaca (NGUYEN *et al.*, 2006). A bacteremia é a presença de bactérias no sangue, que são encontradas em 50% dos casos de sepsse severa e choque séptico, enquanto 20 a 30% dos pacientes não têm causa definida de qualquer fonte (BONE *et al.*, 1992).

A sepsse é um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. O aumento na incidência de sepsse é de 8,7% ao ano somente nos Estados Unidos da América (EUA), sendo que no ano de 1979 havia aproximadamente 164.000 casos e, no ano 2000, ao redor de 660.000 casos (MARTIN *et al.*, 2003). Na estimativa de Angus e colaboradores (2001), a partir de 7 milhões de prontuários hospitalares em sete estados norte-americanos, há 751.000 casos de sepsse severa por ano, com taxa de mortalidade de 28,6%. A sepsse severa causa o mesmo número de mortes que o infarto agudo do miocárdio nos EUA, segundo o *National Center for Health Statistics* (NCHS) (MARTIN *et al.*, 2003). Além disso, estudos na Europa, na Austrália e na Nova Zelândia reportaram a prevalência de sepsse na unidade de terapia intensiva (UTI) entre 5,1% e 30% (ALBERTI *et al.*, 2002; FINFER *et al.*, 2004; PADKIN *et al.*, 2003).

No Brasil, estudo epidemiológico conduzido em 5 estados demonstrou taxas de mortalidade de 11% na SIRS, 33,9% na sepsse, 46,9% na sepsse severa e 52,2% no choque séptico (SILVA *et al.*, 2004). Outro estudo verificou que em 75 UTI, em diferentes regiões, as taxas de mortalidade foram 16,7% na sepsse, 34% na sepsse severa e 65,3% no choque séptico (SALES JUNIOR *et al.*, 2006). A incidência de sepsse tem aumentado devido ao envelhecimento da população, ao maior número de procedimentos invasivos, ao uso de drogas imunossupressoras e ao aumento da prevalência de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency virus* - HIV) (MARTIN *et al.*, 2003; ANGUS *et al.*, 2001).

A sepsse, somada à inflamação, induz a falência múltipla de órgãos, principal causa de morte em UTI (RANGEL-FRAUSTO *et al.*, 1995). Neste contexto, são necessárias intervenções de baixo custo que protejam as células e os tecidos, atenuem a inflamação e preservem funções metabólicas. Para pesquisas, estudos em animais têm sido desenvolvidos utilizando diferentes protocolos de indução à sepsse. A injeção de componentes de bactérias (LPS) via intraperitoneal ou intravenosa submete os animais à endotoxemia, induzindo-os à inflamação em curto prazo (SCHEIERMANN *et al.*, 2011). Já o protocolo de ligação e punção cecal (*cecal ligation and puncture* – CLP) induz inflamação sistêmica proveniente de uma bactéria

na íntegra e viva, o que resulta em maior mortalidade dos animais (LEVY *et al.*, 2003). Não obstante, a administração de LPS é frequentemente usada em estudos de indução de sepse por endotoxemia em modelos de curto prazo. Em estudo realizado em ratos, conduzido por Scheiermann e colaboradores (2011), que comparou o modelo de endotoxemia (5 mg de LPS/kg de peso do animal) com CLP, verificou-se que em ambos houve hipotensão e acidose metabólica, características de sepse severa e choque séptico. A principal diferença das técnicas foi que a ativação das citocinas inflamatórias (incluindo TNF- α) aumentou aos 300 minutos com LPS e após 390 minutos no CLP (SCHEIERMANN *et al.*, 2011).

3.2.2 Metabolismo da glutamina na sepse

O processo infeccioso que ocorre na sepse altera a concentração de proteínas totais no organismo, bem como o balanço nitrogenado e o metabolismo da glutamina (KARINCH *et al.*, 2001). Um dos primeiros estudos de depleção de glutamina no músculo, na sepse, foi publicado em 1982 e correlacionou tal deficiência à redução na taxa de sobrevivência de pacientes (ROTH *et al.*, 1982). Austgen e colaboradores (1992) demonstraram *in vivo* que na endotoxemia a atividade da enzima glutamina sintetase no músculo está aumentada; no entanto, não sendo capaz de manter a concentração da glutamina no tecido, devido a mesma estar sendo liberada do músculo para a circulação (AUSTGEN *et al.*, 1992). Em conjunto com o músculo esquelético, o pulmão também atua na liberação de glutamina para corrente sanguínea, uma vez que apresenta alta atividade da enzima glutamina sintetase (WELBOURNE, 1987), sobretudo na sepse (LUKASZEWICZ *et al.*, 1997). Outro órgão em que ocorre alteração no metabolismo da glutamina durante a sepse é o rim (AUSTGEN *et al.*, 1991a). Nestas condições, o rim passa de órgão consumidor de glutamina para liberador de glutamina, diminuindo sua capacidade de eliminar amônia e manter o equilíbrio ácido-base do organismo (AUSTGEN *et al.*, 1991a).

No tecido intestinal, ocorre diminuição na captação de glutamina circulante durante a endotoxemia (AUSTGEN *et al.*, 1991b), assim como redução de transporte de glutamina na fase luminal e na atividade de glutaminase da mucosa intestinal (SOUBA *et al.*, 1990). Por outro lado, em linfócitos de ratos septicêmicos, a atividade da glutaminase está aumentada (SARANTOS; OCKERT; SOUBA, 1993). E, ainda, o fígado, na endotoxemia, se torna o maior órgão consumidor de glutamina (AUSTGEN *et al.*, 1991a), devido ao maior fluxo

sanguíneo para o tecido, atividade dos transportadores de membrana hepatocelular (INOUE; PACITTI; SOUBA, 1993) e aumento nas citocinas inflamatórias, principalmente TNF- α (KARINCH *et al.*, 2001).

Nas células, como as endoteliais, também ocorre maior captação de glutamina na endotoxemia (HERSKOWITZ *et al.*, 1991), enquanto em fibroblastos o transporte de glutamina é diminuído (DUDRICK; BLAND; SOUBA, 1992). Tais alterações demonstram que em doenças inflamatórias e infecciosas ocorrem alterações no metabolismo de glutamina. Enquanto as concentrações de glutamina no fígado, nos linfócitos e nas células endoteliais são mantidas, as concentrações nos rins, no intestino, no músculo esquelético e no plasma estão diminuídas em relação ao estado basal (KARINCH *et al.*, 2001).

3.3 Suplementação de glutamina

Historicamente, a glutamina não era utilizada como suplemento nutricional, por ser considerado um aminoácido não essencial e ter meia vida curta em solução aquosa. Em fórmulas enterais, é comumente encontrada na concentração característica de proteínas animais e vegetais (SWAILS *et al.*, 1992). No entanto, esta quantidade pode estar superestimada, pois processos de preparação, como alta temperatura e exposição a ácidos, podem degradá-la rapidamente. Contudo, em indivíduos saudáveis, que tenham consumo alimentar adequado, não há necessidade de suplementação (NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996).

Em condições inflamatórias, como as decorrentes da sepse, o consumo de glutamina por células renais e pelo sistema imune aumenta, o que pode levar à demanda que não seja suprida por outros tecidos, como o muscular e o hepático (LIANG *et al.*, 2009; ANDREASEN *et al.*, 2009). Como resultado, a concentração de glutamina no sangue é reduzida. É estimado que quando a glutamina no plasma é menor do que 0,4 mM, em estados de “deficiência de glutamina”, o sistema imune pode ser comprometido; lembrando que concentrações normais estão entre 0,5 e 0,7 mM. (WILMORE; SHABERT, 1998). Estudos, da década de 1990, em camundongos septicêmicos, demonstraram que a suplementação por via oral de glutamina aumenta a taxa de sobrevivência (SUZUKI *et al.*, 1993) e por via parenteral reduz risco de falência múltipla de órgãos decorrente de sepse (YOSHIDA; YAMASSKI; KARBERA, 1993). Em conformidade com estes estudos, Yeh e colaboradores (2004) verificaram que a suplementação de glutamina por via oral, em animais submetidos à sepse,

atenuou a redução na função de linfócitos e neutrófilos e na atividade da GSH. Além disso, estudo recente em modelo animal, de obstrução do tecido intestinal, verificou que a suplementação de glutamina por gavagem foi capaz de manter a integridade funcional da barreira intestinal, reduzindo a translocação bacteriana (SANTOS *et al.*, 2010).

Estudos em humanos, também desde a década de 1990, têm demonstrado que a suplementação de glutamina por via parenteral melhora condições clínicas de indivíduos transplantados de medula óssea (ZIEGLER *et al.*, 1992), diminui risco de atrofia muscular durante estresse metabólico (HICKSON; CZERWINSKI; WEGRZYN, 1995), reduz incidência de infecção hospitalar, melhora o balanço nitrogenado e reduz custo hospitalar (MacBURNEY *et al.*, 1994). Em investigações mais recentes, em condições de deficiência de glutamina, sobretudo em pacientes criticamente enfermos, a suplementação de glutamina por via parenteral tem demonstrado reduzir as complicações clínicas destes indivíduos (WISCHMEYER *et al.*, 2001; ZIEGLER *et al.*, 2005; DECHELOTTE *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2007, ANDREASEN *et al.*, 2009). Neste sentido, em revisão realizada por Wischmeyer (2008), foi evidenciado o papel da suplementação da glutamina por via parenteral em atenuar consequências indesejáveis de pacientes críticos, tais como degradação do tecido intestinal, diminuição das HSP, apoptose celular e inflamação mediada por NF- κ B. Enquanto a recomendação de suplementação de glutamina via parenteral é consistente em pacientes críticos (HEYLAND *et al.*, 2003; KREYMANN, 2006), a suplementação nas vias oral e enteral ainda merece maior investigação, já que a absorção depende da integridade do tecido intestinal (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O guia norte-americano para manejo do paciente crítico recomenda a suplementação de glutamina em indivíduos fazendo uso de nutrição parenteral, a fim de atenuar o estresse oxidativo, manter a integridade intestinal, aumentar as HSP e estimular a proliferação celular em queimados, pós-cirúrgicos e septicêmicos (MCCLAVE *et al.*, 2009). Já a suplementação por via enteral tem demonstrado exercer efeito principalmente na manutenção no epitélio intestinal (ARGENZIO *et al.*, 1994; MCCLAVE *et al.*, 2009). Cabe lembrar que a forma da glutamina suplementada é diferente na nutrição parenteral e na enteral. Enquanto na nutrição parenteral a glutamina é comumente adicionada à solução como dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina ou L-glicil-L-glutamina), devido à maior solubilidade e estabilidade (FUENTES-OROZCO *et al.*, 2004; DECHELOTTE *et al.*, 2006), na via enteral a glutamina livre é misturada com água em quantidade suficiente para passar pela sonda, sendo fornecida de 1 a 3 vezes ao dia em concentração aproximada de 0,3 a 0,5 g/kg/dia (GARREL *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2003). Estes resultados podem ser justificados pela hipótese de que na suplementação via

oral ou enteral a maior parte da glutamina é retida no tecido intestinal (NEWSHOLME, 2001; ADIBI, 2003), sendo que o quanto isto representa não é totalmente elucidado.

Estudos com suplementação aguda oral de glutamina, na forma livre e como dipeptídeo, demonstraram aumento na concentração plasmática de glutamina de 30 a 120 minutos pós-suplementação (BOZA *et al.*, 2000b; KLASSEN *et al.*, 2000; ROGERO *et al.*, 2004). No entanto, no estudo realizado por Rogero e colaboradores (2004), a concentração de glutamina do grupo suplementado agudamente com o dipeptídeo foi 26% superior à do grupo suplementado com L-glutamina livre, 30 minutos após a suplementação (ROGERO *et al.*, 2004). Tal resultado pode ser explicado pela elevada presença do transportador de dipeptídeos Pept-1 e das dipeptidases intracitoplasmáticas no enterócito, o que favorece o aumento da liberação de glutamina e alanina decorrente da suplementação aguda com L-alanil-L-glutamina e, conseqüentemente, promove maior liberação para a circulação (ROGERO; TIRAPEGUI, 2003).

Em condições de estresse metabólico, tais como o exercício físico, tem-se verificado que a suplementação oral crônica com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina promove maior concentração de glutamina, desta vez no tecido muscular e hepático de ratos, em relação à suplementação da glutamina na forma livre (ROGERO *et al.*, 2006; CRUZAT; TIRAPEGUI, 2009; CRUZAT; ROGERO; TIRAPEGUI, 2010). Em indivíduos queimados, a suplementação do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina restaurou a concentração de glutamina no plasma, bem como a permeabilidade do tecido intestinal, reduzindo endotoxemia, tempo de internação e custo hospitalar (ZHOU *et al.*, 2003).

Apesar dos resultados encontrados nos estudos, tanto experimentais como em humanos, sabe-se que na prática muitas vezes o uso do dipeptídeo em nível de saúde pública torna-se inviável devido ao custo extremamente elevado. Neste contexto, formas alternativas de suplementação de glutamina, sob condições de estresse metabólico, têm sido testadas. Foi verificado o efeito da suplementação de uma solução contendo L-glutamina e L-alanina, ambas na forma livre, e do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina em ratos submetidos ao treinamento e ao exercício físico de longa duração (CRUZAT; TIRAPEGUI, 2009; CRUZAT; ROGERO; TIRAPEGUI, 2010). O primeiro estudo verificou que ambas as suplementações foram eficazes em aumentar a concentração de glutamina e glutamato muscular e hepático, o que elevou a concentração tecidual do antioxidante GSH, atenuando o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico de longa duração (CRUZAT *et al.*, 2007; CRUZAT; TIRAPEGUI, 2009). Posteriormente, observou-se que as mesmas suplementações

com glutamina atenuaram a liberação de creatina quinase e citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α e a PgE₂ (CRUZAT; ROGERO; TIRAPEGUI, 2010).

Em outro estudo, ambas as suplementações (L-alanina e L-glutamina na forma livre e dipeptídeo L-alanil-L-glutamina) foram capazes de modular a síntese de HSP e o fator de choque térmico 1 (*heat shock factor-1* - HSF-1) no músculo esquelético de ratos submetidos a exercícios físicos em esteira rolante (PÉTRY *et al.*, 2012). O aumento da glutamina no plasma, quando a mesma é fornecida associada à alanina, pode ser justificado pelo fato de que ambos os aminoácidos têm a mesma propriedade de fornecer nitrogênio e carbono (WOOLFSON, 1983). Assim, a glutamina pode ser poupada das funções ureogênicas e oxidativas e direcionada para outras funções, como a proliferação celular e a síntese de antioxidantes.

O metabolismo da glutamina decorrente da sua suplementação tem sido estudado utilizando diferentes marcações no aminoácido (isótopos ou radioisótopos) (CROSET *et al.*, 2001; BOELEN *et al.*, 2005; BOELEN *et al.*, 2006; LIGTHART-MELIS *et al.*, 2007, MARTIN *et al.*, 2007). Boelens e colaboradores (2006) verificaram, em camundongos, que ambas as suplementações, de [2-¹⁵N]-glutamina ou de dipeptídeo L-alanina-[2-¹⁵N]-glutamina, foram eficazes em aumentar a síntese renal *de novo* da arginina, em 60% e 45%, respectivamente. No estudo, a via enteral foi a que mais contribuiu com o resultado, demonstrando, em animais, a importância do eixo intestino-renal (BOELEN *et al.*, 2006), fato este já evidenciado em estudo anterior do mesmo grupo e com a mesma suplementação com isótopos estáveis (BOELEN *et al.*, 2005). Em outro estudo, desta vez em humanos que efetuaram cirurgia do trato gastrointestinal, com a utilização da suplementação de L-[2-¹⁵N]-glutamina, encontraram-se resultados similares, evidenciando a via enteral como mais efetiva em aumentar a síntese renal de citrulina e arginina (LIGTHART-MELIS *et al.*, 2007). Já a marcação da glutamina com carbono 13 (isótopo) (MARTIN *et al.*, 2007) ou 14 (radioisótopo) (CROSET *et al.*, 2001) fora utilizada para investigar se ocorre gliconeogênese em células intestinais de camundongos em estado de jejum de 5 até 72 horas. Nestes estudos não foi encontrada tal atividade, evidenciando o fígado e o rim como principais órgãos produtores de glicose a partir de glutamina (CROSET *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2007).

A maioria dos estudos que avaliaram a segurança da suplementação de glutamina é de curto prazo em pacientes críticos adultos (GARLICK, 2001). Apesar de “aparentemente” não demonstrar nenhum efeito colateral em curto prazo, a suplementação de glutamina pode acarretar efeitos indesejados em pacientes após suplementação crônica (BRACCO, 2005). Em estudo *in vitro* em células do músculo esquelético verificou-se que a suplementação de

glutamina suprime a expressão da enzima glutamina sintetase (HUANG; WANG; WATFORD, 2007). Neste sentido, deve-se levar em conta que os pacientes críticos que utilizam glutamina por via exógena poderiam ficar dependentes desta suplementação para manutenção da função imune (DIOGUARDI, 2011). Nestes casos, Dioguardi (2011) recomenda o adequado planejamento da descontinuidade da suplementação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 30 camundongos machos do tipo B6 para avaliação da cinética na absorção de diferentes concentrações de glutamina e outros 30 camundongos do mesmo tipo para avaliação da cinética de absorção de solução de L-glutamina nos animais submetidos à endotoxemia, sendo que 15 foram os controles e 15 submetidos ao tratamento com LPS. De cada camundongo obteve-se de 4 a 6 amostras (frações intestinais). Todos os animais tinham aproximadamente 90 dias de vida e peso médio de 22 g, cedidos pelo Biotério do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo CEEA/FCF/88/2009, n° 249) (**Anexo**). Os animais foram mantidos em gaiolas, sob temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, umidade relativa do ar de 55%, obedecendo ao ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro (luz acesa às 19 h), dois animais por caixa. Recebiam ração padrão contendo 54% de carboidrato, 22,5% de proteína, 4,3% de gordura (NUVILAB CR1, Nuvital Nutrientes Ltda., Curitiba) e água *ad libitum*. Os animais foram mortos através de venossecção sob anestesia (80 mg/kg de quetamina e 15 mg/kg de xilazina) durante estado alimentado.

4.2 Técnica de eversão intestinal

A técnica de eversão intestinal recomendada para estudos de absorção (LEVINE *et al.*, 1970; MARY; RAO, 2002; MAHOMOODALLY; GURIB-KAKIM; SUBRATTY, 2007) e proposta por Wilson e Wiseman (1954) foi escolhida por permitir maior precisão na coleta do líquido na camada serosa e expor a camada mucosa ao meio com maior oxigenação (**Figura 8**).

Figura 8. Frações intestinais padrão e evertida de camundongos.

Após morte dos animais, foi feita uma incisão na região abdominal para ressecção do intestino delgado, que foi limpo com uma solução contendo 0,9% de cloreto de sódio (NaCl). Foi retirado o duodeno, sendo utilizados dois terços do intestino remanescente da região proximal a fim de excluir o íleo. O jejuno foi escolhido para estudo, pois é o principal sítio de absorção de aminoácidos e peptídeos (SILK; GRIMBLE; REES, 1985). O mesentério e a gordura foram cuidadosamente retirados e não houve evidência de perfuração.

Para everter-se o intestino, o mesmo foi empalado pela introdução de um bastão de aço inoxidável medindo 300 mm e 2,5 mm de diâmetro até que o mesmo surgisse do lado oposto à introdução. Após, um lado do intestino foi “rolado” sobre o outro até ocorrer a eversão total. Foi utilizada lupa estereoscópica binocular (Tecnival 40-80X) para verificar a presença das vilosidades intestinais do lado externo do intestino. O intestino foi então colocado em placa de Petri na solução salina sobre gelo. Ele foi particionado em frações de 2 a 3 cm de comprimento e utilizou-se um fio de nylon (0,20 mm - Grilon) para dar um nó em uma das extremidades. As amostras foram pesadas em balança analítica (Denver capacidade 200 g e legibilidade 0,1 mg). Após, foram introduzidos 100 µL de solução de 10% de soro do próprio animal em solução de Krebs sem glicose (KREBS; HENSELEIT, 1932) na parte interna do

intestino após inversão (camada serosa), utilizando seringa (Bd Ultra Fine Longa 0,3 mL com agulha 29 g de 12,7 mm) e fio de nylon para dar um nó na outra extremidade. Os tecidos foram examinados antes e após as incubações em microscópio invertido (Olympus ix-81, 400-600X) para avaliação da integridade e da viabilidade celular pela técnica de exclusão do azul Trypan. Além disso, amostras foram coletadas para exames histológicos, pela técnica da hematoxilina/eosina e picrosirios.

A fração do intestino com o líquido dentro foi pesada novamente. O tecido foi então colocado em um frasco de *Warburg* modificado contendo 200 μ L da solução Krebs com glicose ou Krebs sem glicose, L-glutamina (Sigma L-Glutamine ReagentPlus $\geq 99\%$) e L-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]-glutamina (Perkin Elmer). Foram testadas as soluções de Krebs com e sem glicose, a fim de investigar se a presença de glicose na luz intestinal interfere na absorção de glutamina pelo enterócito. Utilizaram-se tampas de borracha flexíveis que possibilitam a introdução de agulha (BD Ultra Fine 12,7 mm, calibre 0,33 mm) para adição de carbogênio (CO_2/O_2 5/95% v/v, Linde) durante 30 s. Os frascos foram para o banho-maria (Precision Reciprocal Shaking Bath) sob temperatura de 23,5°C e agitação de 100 oscilações por minuto, conforme descrito por Levine e colaboradores (1970).

4.3 Tempos de incubação das frações intestinais

Para avaliar a cinética na absorção de glutamina, parte dos frascos com as frações intestinais imersas em solução de Krebs (com ou sem glicose) com L-glutamina e L-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]-glutamina foi diretamente para o gelo (tempo zero – 0) e parte foi para o banho-maria, sob agitação, retirada em 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos e colocada no gelo. Para cada tempo (0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos) e concentração de glutamina estudados (ver abaixo) havia 4 amostras. Após incubação, a fração intestinal foi pesada. O líquido interno (camada serosa) foi retirado e o tecido intestinal foi pesado novamente. O líquido externo (camada mucosa) foi armazenado em microtubo e o tecido foi homogeneizado (Polytron Aggregate Homogenizer – Brinkmann Instruments, Littau/Luzern, Switzerland) em triton (Sigma Triton x-100) na diluição 0,3 ml/100 mg de tecido. Após, foram centrifugados a 4°C por 2 minutos a 16.000g (Hettich modelo Universal 320R).

4.4 Concentrações de L-[^{14}C (U)]-glutamina e L-glutamina

A concentração de L-[^{14}C]-glutamina foi calculada com objetivo de permitir o transporte, após o equilíbrio de concentrações, da camada mucosa para a serosa, de, aproximadamente, 20.000 desintegrações por minuto (dpm), considerado suficiente para leituras estatisticamente significativas. Isso equivale a 0,0090 microcure (μCi), sendo que 1 μCi é igual a $2,22 \times 10^6$ dpm. Foi então definida a concentração de glutamina uniformemente marcada com carbono de número de massa 14 (^{14}C) à proporção de 0,0090 μCi por amostra a ser ensaiada. Como no frasco de L-[^{14}C]-glutamina (Perkin Elmer) tinha 50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, foi utilizado 0,18 μL por amostra.

Já para aferir a radioatividade específica em cada experimento, as concentrações de L-glutamina foram calculadas com base no peso molecular da mesma, que é de 146,14 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$, de maneira a obter-se as seguintes concentrações (em termos de L-glutamina total) a serem testadas:

50 mM = 7,307 mg/ml de L-glutamina (50 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ x 146,14 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$)

40 mM = 5,846 mg/ml de L-glutamina (40 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ x 146,14 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$)

20 mM = 2,920 mg/ml de L-glutamina (20 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ x 146,14 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$)

10 mM = 1,460 mg/ml de L-glutamina (10 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ x 146,14 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$)

4.5 Cálculo da concentração de glutamina nas camadas serosa, mucosa e tecido intestinal

A concentração de glutamina na camada serosa foi calculada com base nas dpm contadas e corrigidas pelo volume. Para conversão das dpm em glutamina (mM), foi considerada a radioatividade específica dividida pela concentração de glutamina em cada meio (10, 20, 40 e 50 mM de glutamina). O mesmo cálculo foi utilizado para concentração de glutamina na camada mucosa e para o tecido, sendo que para este último houve correção pelo peso do tecido e diluição no Triton x-100 (Sigma).

4.6 Radioatividade

Foram coletados 10 µL de cada amostra, tanto da camada serosa (líquido interno), quanto da camada mucosa (líquido externo) e do homogenato do tecido intestinal. Estes foram introduzidos em flaconetes (capacidade 4 mL) preenchidos com líquido de cintilação (Sigma Scintillation Mixture) para contagem da radioatividade em contador beta (Perkin Elmer Tricarb 2800TR Liquid Scintillator). Com base nos valores das radioatividades específicas de cada amostra, foram calculados os fluxos de ^{14}C da face luminal para a serosa em termos de unidades de L-glutamina transportadas de um lado para outro.

4.7 Animais submetidos à endotoxemia

Os animais submetidos à endotoxemia receberam via intraperitoneal 5mg/kg de LPS de bactéria (Sigma - *Lipopolysaccharides from Escherichia coli* O127:B8) em solução de 1mg/ml de água, enquanto os animais controle receberam a mesma quantidade de água. Os animais foram mortos 48 horas após aplicação do LPS. A dose de 5 mg/kg foi escolhida após estudo piloto em que foram testadas as doses de 5, 10, 20 e 30 mg/kg de LPS para avaliar a taxa de sobrevivência dos animais após 48 horas de injeção de LPS (**Tabela 1**).

Tabela 1. Taxa de sobrevivência de camundongos após 48 horas de injeção de LPS.

LPS (mg/Kg de peso)	Nº de animais (morte/total)
5	0 / 6
10	2 / 6
20	4 / 6
30	6 / 6

4.8 Histologia do tecido intestinal

Foram coletadas porções do jejuno antes e após 120 minutos de incubação, a fim de verificar a integridade do tecido intestinal, tanto em animais saudáveis quanto nos submetidos à endotoxemia por LPS. As frações intestinais que geraram o material para histologia seguiram mesmo protocolo de eversão intestinal das demais amostras e foram submetidas ao meio de 50 mM de L-glutamina e Krebs com glicose. Após coleta do material, foram realizadas desidratação, diafanização, infiltração, inclusão na parafina e microtomia, seguindo assim as técnicas histológicas de acordo com Junqueira e Junqueira (1983). A coloração das lâminas com o tecido intestinal foi feita com hematoxilina-eosina (HE), para verificar componentes ácidos e básicos (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), e picrossirios, para diferenciar componentes fibrosos da matriz extracelular (JUNQUEIRA *et al.*, 1979). Após secagem das lâminas, as mesmas foram visualizadas em microscópio Olympus em contraste de fase (PH) e dic nas resoluções 10x, 20x, 40x e 60x. As fotos foram selecionadas e as melhores apresentadas neste trabalho.

4.9 Análise estatística

Os resultados das análises da concentração de glutamina (GLN), dada em mM, na mucosa, na serosa e no tecido foram submetidos à análise de regressão. Os critérios de seleção do tipo de modelo (linear ou não linear) para ajustar os dados experimentais foram o modelo que obtivesse maior valor de coeficiente de determinação (R^2) e significância estatística (p-valor), obtida pelo teste F. Para isso, o tempo, dado em minutos, foi adotado como variável independente e a concentração de GLN como a variável de resposta. Para detectar a intensidade da associação entre a variável independente e a resposta, para cada concentração e parte estudada, foi determinado o coeficiente de correlação (r).

Para a análise dos dados em diferentes tempos, os resultados foram submetidos ao teste de *Hartley*, seguido de ANOVA de uma via, sendo que as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de *Tukey*. Os valores-p foram considerados significativos quando menores que 0,05. Comparações entre médias de duas amostras foram conduzidas pelo teste t de Student, após a verificação da distribuição dos resultados pelo teste de *Shapiro-Wilks*. Todas as análises foram realizadas pelo programa SAS (SAS Institute, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Concentração de glutamina na camada serosa nos meios com 10, 20, 40 e 50 mM de glutamina

Os resultados obtidos após contagem de glutamina marcada com carbono 14 mostraram que a absorção intestinal de glutamina em animais saudáveis é dependente da dose e do tempo de incubação. Nas **Figuras 9 A, B, C, e D**, pode-se observar a cinética (tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40 60, 90 e 120 minutos) na absorção intestinal (líquido na camada serosa) nas doses 10 mM (A), 20 mM (B), 40 mM (C) e 50 mM (D) de glutamina em camundongos. Observa-se que houve aumento linear da concentração de glutamina na camada serosa em meios com 10 e 20 mM de glutamina, enquanto que, em meios com 40 e 50 mM, a análise de regressão mostrou que os resultados do aumento da concentração de glutamina na camada serosa puderam ser melhor explicados por uma curva hiperbólica.

Figura 9 A. Análise de regressão da concentração de glutamina (mM) na camada serosa em meio com 10 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Os valores estão expressos em média.

Figura 9 B. Análise de regressão da concentração de glutamina (mM) na camada serosa em meio com 20 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Os valores estão expressos em média.

Figura 9 C. Análise de regressão da concentração de glutamina (mM) na camada serosa em meio com 40 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Os valores estão expressos em média.

Figura 9 D. Análise de regressão da concentração de glutamina (mM) na camada serosa em meio com 50 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Os valores estão expressos em média

Na **Tabela 2**, verificam-se os resultados da concentração de glutamina na camada serosa em todas as concentrações 10, 20, 40 e 50 mM nos diferentes tempos. Observa-se que existe diferença na concentração de glutamina absorvida e esta é proporcional à dose fornecida. Enquanto no tempo zero (0) não existe diferença significativa entre todas as concentrações (10, 20, 40 e 50 mM), nos demais tempos há esta diferença estatística. O meio com 50 mM destaca-se por ter concentração de glutamina maior e diferente estatisticamente de todos os outros meios (10, 20 e 40 mM) nos tempos 5, 10, 20, 30, 40, 90 e 120 minutos.

Tabela 2. Concentração de glutamina na camada serosa (mM) nos meios com 10, 20, 40 e 50 mM de glutamina nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.

<i>Concentração de glutamina (mM) na serosa</i>				
<i>tempo</i>	10 mM	20 mM	40 mM	50 mM
0	1,36 ± 0,22	1,56 ± 0,31	1,43 ± 0,80	1,91 ± 1,20
5	1,91 ± 0,35 ^{§†}	4,58 ± 1,08 [‡]	6,69 ± 1,53 ^{*‡}	10,71 ± 0,84 ^{*‡§}
10	1,52 ± 0,64 ^{‡§†}	6,06 ± 1,13 ^{*‡}	7,16 ± 0,95 ^{*‡}	15,64 ± 0,84 ^{*‡§}
20	3,83 ± 0,60 ^{§†}	7,63 ± 0,23 [‡]	9,57 ± 1,88 ^{*‡}	17,05 ± 1,13 ^{*‡§}
30	4,47 ± 0,49 ^{‡§†}	8,52 ± 0,12 ^{*§†}	13,45 ± 0,17 ^{*‡}	20,04 ± 0,80 ^{*‡§}
40	4,04 ± 0,86 ^{‡§†}	9,62 ± 0,93 ^{*§†}	13,08 ± 1,19 ^{*‡}	23,05 ± 0,80 ^{*‡§}
60	4,96 ± 0,62 [‡]	9,68 ± 0,10	16,73 ± 4,69	23,67 ± 0,53 [*]
90	5,05 ± 0,32 ^{‡§†}	11,50 ± 1,61 ^{*§†}	19,82 ± 1,18 ^{*‡}	24,04 ± 0,34 ^{*‡§}
120	9,24 ± 0,85 ^{‡§†}	15,78 ± 1,39 ^{*‡}	19,52 ± 2,00 ^{*‡}	28,74 ± 0,43 ^{*‡§}

Os valores são expressos em média e desvio padrão (ANOVA One Way Post Hoc Tukey HSD).

* diferença em relação à concentração 10 mM (p<0,05)

† diferença em relação à concentração 20 mM (p<0,05)

§ diferença em relação à concentração 40 mM (p<0,05)

‡ diferença em relação à concentração 50 mM (p<0,05)

5.2 Concentração de glutamina no tecido intestinal nos meios com 10, 20, 40 e 50 mM de glutamina

Os resultados da radioatividade no tecido enteral de camundongos podem ser vistos nas **Figuras 10 A, B, C e D**. Observa-se que o aumento na concentração de unidades de glutamina no tecido intestinal é linear para 10 mM (A) e 20 mM (B) e logarítmica nos meios com 40 mM (C) e 50 mM (D), de acordo com o tempo.

Figura 10 A. Análise de regressão da concentração de glutamina (mM) no tecido intestinal em meio com 10 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Os valores estão expressos em média.

Figura 10 B. Análise de regressão da concentração de glutamina (mM) no tecido intestinal em meio com 20 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Os valores estão expressos em média.

Figura 10 C. Análise de regressão da concentração de glutamina (mM) no tecido intestinal em meio com 40 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Os valores estão expressos em média.

Figura 10 D. Análise de regressão da concentração de glutamina (mM) no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Os valores estão expressos em média.

Na **Tabela 3**, estão descritos os resultados da concentração de glutamina retida no tecido intestinal nos meios com 10, 20, 40 e 50 mM de glutamina nos diferentes tempos. Enquanto em 5 minutos não houve diferença significativa entre os grupos, nos tempos 40, 60 e 90 minutos todos são diferentes estatisticamente entre si. Em meio com 40 mM, a concentração de unidades de glutamina é significativamente maior do que todos os outros meios (10, 20 e 50 mM), a partir de 40 minutos, no tecido intestinal.

Tabela 3. Concentração de glutamina (mM) no tecido intestinal nos meios com 10, 20, 40 e 50 mM de glutamina nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.

<i>Concentração de glutamina no tecido intestinal (mM)</i>				
<i>tempo</i>	10 mM	20 mM	40 mM	50 mM
0	1,94 ± 0,73 ^{§‡}	2,94 ± 0,06 ^{§‡}	5,11 ± 0,35 ^{*†}	5,54 ± 0,85 ^{*†}
5	2,80 ± 1,19	6,51 ± 2,29	5,28 ± 0,29	6,16 ± 0,99
10	5,17 ± 0,67 ^{†‡}	7,10 ± 0,73 ^{*‡}	6,31 ± 0,45 ^{*‡}	13,14 ± 0,34 ^{*†§}
20	4,75 ± 0,54 ^{§‡}	7,14 ± 1,89 ^{§‡}	13,24 ± 0,25 ^{*†}	13,31 ± 0,26 ^{*†}
30	4,89 ± 1,17 ^{†§‡}	9,19 ± 0,75 ^{*§‡}	13,24 ± 0,12 ^{*†}	13,13 ± 0,41 ^{*†}
40	4,87 ± 0,53 ^{†§‡}	9,03 ± 1,3 ^{*§‡}	16,16 ± 0,24 ^{*†‡}	14,26 ± 0,37 ^{*†§}
60	4,82 ± 0,02 ^{†§‡}	9,71 ± 0,14 ^{*§‡}	17,08 ± 0,53 ^{*†‡}	15,55 ± 0,89 ^{*†§}
90	5,50 ± 0,34 ^{†§‡}	11,54 ± 1,71 ^{*§‡}	17,76 ± 0,74 ^{*†‡}	15,09 ± 0,89 ^{*†§}
120	6,71 ± 0,24 ^{†§‡}	13,89 ± 0,18 ^{*§}	19,35 ± 0,04 ^{*†‡}	15,16 ± 0,89 ^{*§}

Os valores são expressos em média e desvio padrão (ANOVA One Way Post Hoc Tukey HSD).

* diferença em relação à concentração 10 mM (p<0,05)

† diferença em relação à concentração 20 mM (p<0,05)

§ diferença em relação à concentração 40 mM (p<0,05)

‡ diferença em relação à concentração 50 mM (p<0,05)

5.3 Concentração de glutamina na camada mucosa nos meios com 10, 20, 40 e 50 mM de glutamina

A concentração de unidades de glutamina na camada mucosa diminuiu de acordo com o tempo e são apresentadas nas **Figuras 11 A, B, C e D**. Em meios com 10 (A) e 40 (C) mM de glutamina a regressão foi linear, enquanto em 20 (B) e 50 (D) mM a regressão da concentração de glutamina na camada mucosa foi melhor representada por uma curva logarítmica.

Figura 11 A. Análise de regressão da concentração de glutamina (mM) na camada mucosa em meio com 10 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Os valores estão expressos em média.

Figura 11 B. Análise de regressão da concentração de glutamina (mM) na camada mucosa em meio com 20 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Os valores estão expressos em média.

Figura 11 C. Análise de regressão da concentração de glutamina (mM) na camada mucosa em meio com 40 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Os valores estão expressos em média.

Figura 11 D. Análise de regressão da concentração de glutamina (mM) na camada mucosa em meio com 50 mM de glutamina nos tempos de incubação 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Os valores estão expressos em média.

Na **Tabela 4**, verifica-se a concentração de glutamina na camada mucosa (mM) nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos nos meios com 10, 20, 40 e 50 mM de glutamina. Houve diminuição da concentração da radioatividade em todos os grupos, sendo que há diferença estatística entre os mesmos (10, 20, 40 e 50 mM) nos diferentes tempos; exceto nos tempos 20 e 30 minutos, nos quais a concentração de glutamina não demonstrou ser diferente estatisticamente nos meios com 40 e 50 mM.

Tabela 4. Concentração de glutamina (mM) na camada mucosa nos meios com 10, 20, 40 e 50 mM de glutamina nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos.

<i>Concentração de glutamina na mucosa (mM)</i>				
<i>tempo</i>	10 mM	20 mM	40 mM	50 mM
0	8,26 ± 0,19 ^{‡§†}	18,22 ± 0,02 ^{*§†}	29,27 ± 0,29 ^{*‡}	46,24 ± 0,60 ^{*‡§}
5	6,88 ± 0,49 ^{‡§†}	18,63 ± 0,53 ^{*§†}	29,32 ± 0,87 ^{*‡}	44,47 ± 1,03 ^{*‡§}
10	6,96 ± 0,01 ^{‡§†}	16,49 ± 0,78 ^{*§†}	28,38 ± 0,29 ^{*‡}	44,43 ± 1,05 ^{*‡§}
20	6,00 ± 0,10 ^{‡§†}	14,74 ± 1,01 ^{*§†}	28,88 ± 2,11 ^{*‡}	29,63 ± 1,38 ^{*‡}
30	5,41 ± 0,04 ^{‡§†}	14,76 ± 0,87 ^{*§†}	28,12 ± 1,25 ^{*‡}	29,61 ± 0,61 ^{*‡}
40	4,71 ± 0,16 ^{‡§†}	13,54 ± 0,43 ^{*§†}	24,92 ± 0,96 ^{*‡}	29,17 ± 1,32 ^{*‡§}
60	4,75 ± 0,77 ^{‡§†}	12,93 ± 0,74 ^{*§†}	20,51 ± 0,96 ^{*‡}	29,78 ± 0,53 ^{*‡§}
90	4,62 ± 0,24 ^{‡§†}	13,61 ± 0,23 ^{*§†}	20,24 ± 0,72 ^{*‡}	29,62 ± 1,12 ^{*‡§}
120	3,27 ± 0,28 ^{‡§†}	11,98 ± 0,33 ^{*§†}	19,60 ± 0,03 ^{*‡}	25,25 ± 1,26 ^{*‡§}

Os valores são expressos em média e desvio padrão (ANOVA One Way Post Hoc Tukey HSD).

* diferença em relação à concentração 10 mM (p<0,05)

† diferença em relação à concentração 20 mM (p<0,05)

§ diferença em relação à concentração 40 mM (p<0,05)

‡ diferença em relação à concentração 50 mM (p<0,05)

5.4 Comparação entre a concentração de glutamina na camada serosa e no tecido intestinal

Nas **Figuras 12 A, B, C e D**, podem-se observar a comparação entre as concentrações de glutamina (mM) absorvida (camada serosa) e retida no tecido intestinal em valores absolutos nos meios com 10 mM (A), 20 mM (B), 40 mM (C) e 50 mM (D) de glutamina em todos os tempos (0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos). Em 10 e 20 mM, não houve diferença significativa na concentração de glutamina entre a camada serosa e no tecido, exceto nos tempos 10 e 120 minutos, em 10 mM, e nos tempos 0 e 120 minutos, em 20 mM. Nestes meios (10 e 20 mM), em 120 minutos, a concentração de glutamina na camada serosa foi significativamente maior que a retida no tecido intestinal. Já em 40 mM, a concentração de glutamina apresentou diferença significativa nos tempos 0, 5, 20, 40 e 90 minutos, enquanto em 10, 30, 60 e 120 minutos não apresentou diferença. No meio com 50 mM, a concentração

de unidades de glutamina foi maior na camada serosa a partir de 5 minutos até o último tempo estudado, 120 minutos.

Figura 12 A. Concentração de glutamina (mM) na camada serosa e no tecido intestinal em meio com 10 mM de glutamina nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (*teste-t*).

Figura 12 B. Concentração de glutamina (mM) na camada serosa e no tecido intestinal em meio com 20 mM de glutamina nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (*teste-t*).

Figura 12 C. Concentração de glutamina (mM) na camada serosa e no tecido intestinal em meio com 40 mM de glutamina nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (*teste-t*).

Figura 12 D. Concentração de glutamina (mM) na camada serosa e no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (*teste-t*).

5.5 Comparação entre a concentração de glutamina na camada mucosa e a somatória das concentrações de glutamina na camada serosa e tecido intestinal

Nas **Figuras 13 A, B, C e D** estão apresentadas as concentrações de unidades de glutamina na camada mucosa e a somatória das camadas serosa e tecido intestinal. Em todos os meios, 10 (A), 20 (B), 40 (C) e 50 (D) mM de glutamina (GLN), houve um ponto de equilíbrio, seguido de maior concentração de glutamina na somatória das camadas serosa e tecido intestinal em relação à camada mucosa. Neste ponto de equilíbrio, não houve diferença estatística entre os grupos, sendo este em 10 minutos (10 e 20 mM GLN), 20 minutos (20 e 50 mM GLN) e 30 minutos (40 mM GLN).

Figura 13 A. Concentração de glutamina (mM) na somatória da camada serosa (SER) com tecido intestinal (TEC) e na camada mucosa, em meio com 10 mM de glutamina, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (*teste-t*).

Figura 13 B. Concentração de glutamina (mM) na somatória da camada serosa (SER) com tecido intestinal (TEC) e na camada mucosa, em meio com 20 mM de glutamina, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (*teste-t*).

Figura 13 C. Concentração de glutamina (mM) na somatória da camada serosa (SER) com tecido intestinal (TEC) e na camada mucosa, em meio com 40 mM de glutamina, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (*teste-t*).

Figura 13 D. Concentração de glutamina (mM) na somatória da camada serosa (SER) com tecido intestinal (TEC) e na camada mucosa, em meio com 50 mM de glutamina, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (*teste-t*).

5.6 Massa corporal dos camundongos controles e submetidos à endotoxemia por LPS

O peso corporal dos animais submetidos à endotoxemia foi significativamente menor do que os animais do grupo controle em 24 e 48 horas após injeção de LPS (**Tabela 5**).

Tabela 5. Massa corporal (g) dos camundongos controle e endotoxêmicos nos tempos 0, 24 e 48 horas.

<i>Tempo</i>	<i>Controle</i>	<i>Endotoxemia</i>	<i>P</i>
0 horas	23,1 ± 3,8	21,6 ± 1,9	0,25
24 horas	23,6 ± 3,7	19,3 ± 1,6*	< 0,001
48 horas	23,7 ± 3,9	18,1 ± 1,7*	< 0,001

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 15$ por grupo. * Diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,01$) (*teste t*).

5.7 Consumo de ração dos camundongos controles e submetidos à endotoxemia por LPS

O consumo de ração dos animais submetidos à endotoxemia foi significativamente menor do que o dos animais do grupo controle tanto em 24, quanto em 48 horas após injeção de LPS (**Tabela 6**).

Tabela 6. Consumo de ração (g/dia) dos camundongos controles e submetidos à endotoxemia em 24 e 48 horas após injeção de LPS.

<i>Tempo</i>	<i>Controle</i>	<i>Endotoxemia</i>	<i>P</i>
24 horas	1,26 ± 0,30	0,16 ± 0,10*	< 0,001
48 horas	1,46 ± 0,25	0,32 ± 0,22*	< 0,001

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 15$ por grupo. * Diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,01$) (*teste t*).

5.8 Histologia do tecido intestinal

Os cortes histológicos intestinais submetidos à hematoxilina-eosina podem ser vistos na **Figura 14**. Observa-se a presença de vilosidades e tecido íntegro no corte obtido a partir do jejuno de camundongos saudáveis (A). Após 120 minutos de incubação, nota-se alteração na estrutura submucosa do intestino (B). Já a porção do jejuno submetida à endotoxemia apresenta erosões, desprendimento de células, edema na mucosa e submucosa, além da desconfiguração das vilosidades (reduzindo seu tamanho) (C), fato que se intensifica após 120 minutos de incubação (D).

Figura 14. Histologia jejunal submetida à HE de animais saudáveis (A), incubados por 120 minutos (B), animais endotoxêmicos (C) e endotoxêmicos incubados por 120 minutos (D) (cortes horizontais, PH = contraste de fase; dic = contraste dic).

Na **Figura 15**, observa-se a histologia do jejuno de camundongos saudáveis e submetidos à endotoxemia por LPS após imersão em corante picosirios. No corte do jejuno de animal saudável (A), verifica-se a integridade da matriz celular, sendo que após 120 minutos de incubação (B) ocorre deterioração das fibras de colágeno localizadas na camada mucosa. Já na presença de LPS (C), observam-se erosões no tecido e destruição da matriz celular tanto nas vilosidades, quanto na camada mucosa e submucosa, o que é acentuado após 120 minutos de incubação (D).

Figura 15. Histologia jejunal submetida a picosirios de animais saudáveis (A), incubados por 120 minutos (B), animais endotoxêmicos (C) e endotoxêmicos incubados por 120 minutos (D) (cortes horizontais, dic = contraste dic).

5.9 Concentração de glutamina na camada serosa de animais controles e submetidos à endotoxemia em meio com 50 mM de L-glutamina

Nas **Figuras 16 A e B** observam-se a cinética de absorção intestinal de glutamina com e sem a presença de glicose no meio de 50 mM de glutamina nos animais controles (A) e submetidos à endotoxemia (B). No meio com glicose, a absorção de glutamina foi significativamente maior do que no meio sem glicose, na maior parte dos tempos, inclusive em 120 minutos, em ambos os grupos, controle e endotoxêmicos.

Figura 16 A. Concentração de glutamina (mM) na camada serosa em meio com 50 mM de glutamina, com e sem glicose, nos camundongos controle e tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (ANOVA One Way Post Hoc Tukey HSD).

Figura 16 B. Concentração de glutamina (mM) na camada serosa em meio com 50 mM de glutamina com e sem glicose, em animais submetidos à endotoxemia nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (*ANOVA One Way Post Hoc Tukey HSD*).

Nas **Figura 17 A e B** percebemos que a concentração de glutamina na camada serosa foi significativamente maior no grupo controle do que no grupo submetido à endotoxemia por LPS, tanto no meio com glicose (A) quanto sem glicose (B) em 120 minutos.

Figura 17 A. Concentração de glutamina (mM) na camada serosa em meio com 50 mM de glutamina em camundongos controle e submetidos à endotoxemia, na presença de glicose, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (ANOVA One Way Post Hoc Tukey HSD).

Figura 17 B. Concentração de glutamina (mM) na camada serosa em meio com 50 mM de glutamina em camundongos controle e submetidos à endotoxemia na ausência de glicose, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (ANOVA One Way Post Hoc Tukey HSD).

5.10 Concentração de glutamina no tecido intestinal de animais controles e submetidos à endotoxemia em meio com 50 mM de L-glutamina

Nas **Figuras 18 A e B** observam-se a retenção de unidades de glutamina no tecido intestinal em meios com glicose e sem glicose nos animais controles (A) e submetidos à endotoxemia (B). No grupo controle, a retenção tecidual de glutamina foi maior no meio com glicose nos tempos 10, 20, 30, 40, 60 e 90 minutos. Já no grupo que foi submetido à endotoxemia houve diferença estatística a partir dos 20 minutos, sendo que o grupo com glicose teve maior retenção de glutamina no tecido intestinal do que o grupo sem glicose.

Figura 18 A. Concentração de glutamina (mM) no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina com e sem glicose em camundongos controle nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (ANOVA One Way Post Hoc Tukey HSD).

Figura 18 B. Concentração de glutamina (mM) no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina com e sem glicose em camundongos submetidos à endotoxemia nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (ANOVA One Way Post Hoc Tukey HSD).

Nas **Figuras 19 A e B** é possível constatar que a retenção de glutamina no tecido intestinal em meio com glicose (A) foi maior no grupo submetido à endotoxemia nos tempos 60, 90 e 120 minutos em relação ao grupo controle. Já em meio sem glicose (B) não houve diferença estatística entre os grupos controle e endotoxemia, exceto no tempo 120 minutos.

Figura 19 A. Concentração de glutamina (mM) no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina com glicose em camundongos controle e submetidos à endotoxemia nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (ANOVA One Way Post Hoc Tukey HSD).

Figura 19 B. Concentração de glutamina (mM) no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina sem glicose em camundongos controle e submetidos à endotoxemia nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (ANOVA One Way Post Hoc Tukey HSD).

5.11 Comparação entre a concentração de glutamina na camada serosa e no tecido intestinal de camundongos submetidos à endotoxemia

Ao comparar a concentração do aminoácido na camada serosa e tecido intestinal de animais submetidos à endotoxemia, verifica-se que tanto em meio com glicose (**Figura 20 A**), quanto em meio sem glicose (**Figura 20 B**), a concentração de glutamina é maior na camada serosa em relação ao tecido intestinal na maioria dos tempos, inclusive em 120 minutos.

Figura 20 A. Concentração de glutamina (mM) na camada serosa e no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina na presença de glicose, nos camundongos submetidos à endotoxemia, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (*teste-t*).

Figura 20 B. Concentração de glutamina (mM) na camada serosa e no tecido intestinal em meio com 50 mM de glutamina na ausência de glicose, nos camundongos submetidos à endotoxemia, nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos. Valores expressos em média e desvio padrão. Concentrações que contêm asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (*teste-t*).

6. DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado a importância da glutamina em diferentes tecidos do organismo, como fígado (LAVOINNE *et al.*, 1996; CURI *et al.*, 1997), rins (YOUNG-GYU *et al.*, 2001), intestino (RHOADS *et al.*, 1997; NEWSHOLME *et al.*, 2003a), músculo (NEWSHOLME *et al.*, 2003b) e também no sistema imune (CURI *et al.*, 1997; PITHON-CURI *et al.*, 2003). A manutenção das concentrações de glutamina no sangue, em condições fisiológicas, é proveniente da síntese de glutamina através da enzima glutamina sintetase (KREBS, 1935), principalmente em fígado, cérebro, pulmão e músculo esquelético (NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996; ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996). E, ainda, a glutamina é proveniente de via exógena, através de alimentos, como carnes, aves, laticínios, soja (CURI, 2000), ou da suplementação. No entanto, parte da glutamina consumida é retida e metabolizada no próprio enterócito, não atingindo a circulação (RHOADS *et al.*, 1997; ADIBI, 2003).

No presente estudo, foi investigada a cinética de absorção de glutamina em diferentes concentrações na luz intestinal. Verificou-se que houve aumento nas unidades de glutamina até 120 minutos após suplementação, independentemente da dose fornecida. Tal resultado está de acordo com estudo realizado por Rogero e colaboradores (2004), no qual foi detectado aumento na glutaminemia de ratos até 120 minutos após gavagem com o aminoácido na forma livre. No entanto, neste estudo, foi demonstrado que a magnitude deste aumento difere entre a suplementação de L-glutamina e a de dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (ROGERO *et al.*, 2004). A justificativa disso é que parte deste aminoácido na forma livre é utilizada pelo próprio intestino (WINDMULLER, 1982; ZIEGLER *et al.*, 1990; DÉCHELOTTE *et al.*, 1991; RERAT *et al.*, 1992; ADIBI, 2003).

Além disso, verificou-se que, em meio com 50 mM, a absorção de glutamina foi maior estatisticamente do que nos outros meios. Este dado mostra que altas doses de suplementação propiciam maior passagem de glutamina para corrente sanguínea. Estudos de suplementação de glutamina por via oral ou enteral em humanos utilizam doses variadas do aminoácido, sendo que as mais comumente utilizadas são de 0,3 a 0,5 g/kg/dia (McCLAIVE *et al.*, 2009) ou até 1 g/kg/dia em ratos (CRUZAT; TIRAPEGUI, 2009; CRUZAT; ROGERO; TIRAPEGUI, 2010). A comparação das doses utilizadas neste estudo com as referidas nos trabalhos de suplementação é inviável devido à técnica de suplementação. Enquanto em humanos ou animais a suplementação de glutamina é oferecida por via oral, enteral ou gavagem (animais),

passando por uma diluição decorrente das secreções digestivas até alcançar o jejuno (ISENMAN; LIEBOW; ROTHMAN, 1999; O'KEEF *et al.*, 2003), neste estudo, a suplementação foi oferecida diretamente para a fração intestinal.

No mesmo sentido, a retenção tecidual de glutamina aumenta conforme a dose oferecida, ao mesmo tempo em que a concentração de glutamina na face luminal diminui. A exceção foi que, neste estudo, a retenção tecidual foi maior em meio com 40 mM do que com 50 mM a partir de 40 minutos. Isso demonstra que altas concentrações de aminoácidos estimulam o transporte tanto através dos enterócitos, quanto entre os enterócitos, ou seja, transcelular e paracelular (PAPPERHEIMER, 2001); assim, a alta concentração de glutamina no lúmen (50 mM) permite maior acesso à corrente sanguínea, não sendo retida e consumida por células intestinais.

Uma vez que a pergunta recorrente é qual a proporção em que a suplementação de glutamina alcança a corrente sanguínea, foi feita a comparação da concentração de unidades da mesma na camada serosa e no tecido intestinal. Em meios com 10 e 20 mM de glutamina houve equilíbrio entre os compartimentos; no entanto, aos 120 minutos houve maior absorção do que retenção no tecido intestinal, fato que demonstra que a absorção é tempo-dependente. Além disso, nos enterócitos, parte da glutamina é convertida em outros aminoácidos (glutamato, citrulina, prolina, alanina) que são liberados para corrente sanguínea (WINDMUELLER; SPAETH, 1975; WINDMUELLER; SPAETH, 1978) e outra parte em ácidos orgânicos (cítrico, láctico, málico, alfa-cetoglutarato, succinato, pirúvico, fumárico) ou dióxido de carbono (WINDMUELLER; SPAETH, 1974). Apesar de pesquisadores terem sugerido que o intestino é capaz de fazer gliconeogênese a partir de aminoácidos durante jejum prolongado ou dietas ricas em proteínas (MITHIEUX *et al.*, 2004; MITHIEUX *et al.*, 2005), estudo recente com glutamina marcada no carbono 13 não encontrou nenhuma evidência de gliconeogênese no intestino delgado (MARTIN *et al.*, 2007).

Já com 40 mM do aminoácido no lúmen, a concentração de glutamina foi maior alternadamente no tecido e na camada serosa até alcançar o equilíbrio em 120 minutos. Sugere-se que as células epiteliais adquiriram glutamina tanto através da membrana apical do enterócito como da membrana basolateral, o que já fora evidenciado em estudo de Horvath e colaboradores (1996). Em estudos com ratos, verificou-se que de 25 a 30% da glutamina da circulação é captada por enterócitos e convertida em dióxido de carbono, amônia, alanina, citrulina, prolina, glutamato e ornitina (WINDMUELLER; SPAETH, 1978; WINDMUELLER; SPAETH, 1980).

Apenas em 50 mM a absorção de glutamina foi significativamente maior (90%) do que a retenção intestinal em 120 minutos. Isso demonstra que possivelmente não houve saturação dos transportadores de aminoácidos tanto da membrana apical, quanto da membrana basolateral. Na membrana apical, o principal sistema de transporte de aminoácidos neutros, entre eles glutamina, é o sistema B⁰ dependente de sódio (SATO *et al.*, 1989; CHRISTENSEN, 1990). O sistema B⁰⁺ (VAN WINKLE; CAMPIONE; GORMAN, 1988; MUNCK; MUNCK, 1994) e o ASC (MAENZ *et al.*, 1992; MUNCK; MUNCK, 1999) foram identificados na membrana apical apenas em animais (coelhos e ratos) e não em humanos. Na membrana basolateral, o principal transporte de glutamina é feito pelo sistema A (AL-MAHROOS; ABUMRAD; GHISHAN, 1990; TAYLOR; EGAN; RENNIE, 1989; WILDE; KILBERG, 1991), sendo que o transporte de glutamina pode ser inibido neste sistema com a presença de outro aminoácido neutro (BROER, 2008). O alto potencial dos sistemas de transporte de aminoácidos justifica os resultados de Cruzat e Tirapegui (2009) e Cruzat e colaboradores (2010), nos quais a suplementação de L-glutamina associada a L-alanina (apolar), ambas na forma livre, foi eficaz em manter o estado redox e diminuir inflamação e lesão muscular decorrentes do exercício físico exaustivo. Estes resultados se devem ao fato de que a alanina também serve como substrato para os enterócitos, poupando assim a glutamina e permitindo sua entrada na circulação (WOOLFSON, 1983). Em estudo realizado por Windmüller (1982), verificou-se que ao expor o intestino de ratos a 6 mM de [C¹⁴]-glutamina, 34% alcançaram a corrente sanguínea. Já quando a dose aumentou para 45 mM de [C¹⁴]-glutamina, a concentração no plasma chegou a 70% do total fornecido (WINDMÜLLER, 1982). O presente estudo confirma os resultados de Windmüller (1982), que verificou que, quanto maior a dose fornecida, maior a liberação de glutamina pelos enterócitos.

Considerando que em dietas normoproteicas a concentração de aminoácidos no lúmen é de aproximadamente 20 mM (ADIBI; MERCER, 1973), podendo chegar até 120 mM em peptídeos (BAI, 1994), a alta concentração de glutamina (50 mM) desencadeia o transporte paracelular, que ocorre em concentrações altas de aminoácidos no lúmen (PAPPENHEIMER, 1993).

Cabe ressaltar que, no presente estudo, houve transporte ativo de unidades de glutamina para o interior do intestino e para a face serosa, já que houve aumento na radioatividade com o tempo, mantido mesmo sendo proveniente do meio menos concentrado (lúmen) para os compartimentos que já apresentavam concentração mais alta de glutamina. O transporte ativo de aminoácidos neutros já foi identificado através dos sistemas dependentes de sódio y⁺L, A, ASC, B⁰ e o sistema dependente de sódio e cloro B⁰⁺ (DEVES; BOYD,

1998; MUNCK *et al.*, 2000). Estes co-transportadores de aminoácidos dependentes de sódio são energizados através de um gradiente eletroquímico mantido pela enzima ATPase- Na^+ - K^+ na membrana basolateral de enterócitos (TALUKDER *et al.*, 2008).

Após identificar maior absorção de glutamina em meio com 50 mM em animais saudáveis, testamos a cinética da absorção intestinal de glutamina na mesma dose em animais submetidos à endotoxemia. Primeiramente observamos perda de peso nos animais tratados com LPS, caracterizando o que ocorre na sepse (COONEY; KIMBALL; VARY, 1997; VARY, 1998). Nesta condição, ocorre desequilíbrio entre a síntese e a degradação proteica devido à maior proteólise, resultando em diminuição da massa muscular (BIOLO *et al.*, 1997). Os aminoácidos derivados do músculo, entre eles a glutamina, se deslocam para região esplânica, rins e sistema imune (SOUBA; AUSTGEN, 1990; BRUINS; SOETERS; DEUTZ, 2000), para oxidação e produção de energia (VARY, 1999). A presença de LPS de bactérias gram-negativas ativa o receptor TLR4 (*toll-like-receptor-4*) (BEUTLER *et al.*, 2003) e, subsequentemente, o NF- κ B, a liberação de citocinas e a indução de enzimas, como a óxido nítrico sintetase (*nitric oxide synthetase* - NOS) (PALSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2004), caracterizando a patogênese do choque séptico. A liberação de citocinas e a produção de óxido nítrico são fatores predisponentes do estado catabólico na sepse (MORRIS JR; BILLIAR, 1994; COONEY; KIMBALL; VARY, 1997; VARY, 1998). O aumento do óxido nítrico, associado à disfunção mitocondrial e à captação de oxigênio prejudicada, causa diminuição da contratilidade muscular e fadiga, enquanto inibidores da óxido nítrico sintetase restauram a atividade muscular contrátil (GATH *et al.*, 1996; BOVERIS; ALVAREZ; NAVARRO, 2002).

A redução da massa corporal dos camundongos foi acompanhada pelo menor consumo de ração pelos animais submetidos a LPS, o que já fora previamente observado em outros estudos (JOHNSON, 1997; STEIGER *et al.*, 1999). No estudo de Steiger e colaboradores (1999), em ovelhas, foi verificado que logo após a injeção de LPS há aumento na glicose e no cortisol sanguíneos e na segunda fase (aproximadamente 6 horas após injeção de LPS) ocorre redução na glicose sanguínea e aumento da lipólise. Cabe ressaltar que estes estudos, assim como o presente estudo, utilizaram doses altas e agudas de LPS a fim de provocar endotoxemia, caracterizando a sepse. Por outro lado, estudos recentes têm correlacionado ganho de peso, resistência à insulina e aumento do risco de doenças cardiovasculares com maiores concentrações de LPS no sangue, cronicamente conhecido como “endotoxemia metabólica” (MILLER; CAPPuccio, 2009; MANCO, 2009). As dietas ricas em lipídeos aumentam a absorção de LPS que, associada à maior disponibilidade de quilomícrons (que

transportam LPS na corrente sanguínea), provocam resposta inflamatória sistêmica (via ligação com TLR4) e aumento da lipogênese no adipócito e no fígado, maior gliconeogênese no fígado e redução da oxidação de gordura no músculo esquelético (CANI *et al.*, 2008; MANCO; PUTIGNANI; BOTTAZZO, 2010). Neste caso, a maior permeabilidade da membrana intestinal é associada ao risco aumentado de síndrome metabólica em indivíduos (MILLER; CAPPuccio, 2009; MANCO, 2009).

A histologia apresentada neste estudo demonstrou que, em condições de endotoxemia, ocorrem alterações no tecido intestinal, como inchaço na camada mucosa e submucosa, danos severos nas vilosidades e desintegração da matriz celular, o que já fora previamente observado em outros estudos em ratos (JACKSON;; SEWELL, 2000; SANTOS *et al.*, 2010). Após 120 minutos de incubação houve alteração estrutural leve nos tecidos intestinais de animais saudáveis e mais acentuada em animais submetidos à endotoxemia por LPS. Cabe lembrar que cuidados foram tomados a fim de manter a integridade do tecido intestinal na técnica de eversão intestinal, conforme proposto por Levine e colaboradores (1970). Segundo estes autores, a temperatura mantida em 23°C e a morte sob anestesia são recursos que reduzem os danos ao tecido intestinal. A histologia de tecidos de animais submetidos à incubação demonstrou que, sob temperatura de 37°C, em 30 minutos, ocorre necrose de 50 a 75% do epitélio de ratos; já em *hamster*, demonstrou-se que após 60 minutos de incubação a 23°C, a integridade da membrana é mantida com apenas perda de detalhes nas vilosidades (LEVINE *et al.*, 1970).

No presente estudo, verificamos maior absorção de glutamina com a presença de glicose tanto em animais controle quanto nos submetidos à endotoxemia. O transporte de aminoácidos e glicose a partir do lúmen até a corrente sanguínea ocorre tanto pela via transcelular como paracelular (KELLET, 2001). O transporte de glicose dependente de sódio (*sodium-glucose dependent transport-1* - SGLT-1) induz a fosforilação da miosina de cadeia leve, contração dos anéis de perijunções de actomiosina e contração do citoesqueleto (NUSRAT; TURNER; MADARA, 2000), consequentemente abrindo as junções apertadas (*tight junctions*) e encolhendo o enterócito, possibilitando o transporte paracelular (PAPPERHEIMER, 2001). Além disso, a glicose é descarregada para o fluido intercelular após as junções devido a sua concentração aumentada no citoplasma apical, proporcionando força osmótica através das junções dilatadas, facilitando também o transporte de aminoácidos (KELLET, 2001).

Neste sentido, o transporte paracelular permite maior concentração de glicose e aminoácidos nos canais laterais das células intestinais do que no meio intracelular. Tal fato é

devido ao transporte de substâncias no interior do enterócito estar prejudicado, pois o citoplasma está obstruído por núcleo, mitocôndrias, retículo endoplasmático e outras organelas (PAPPERHEIMER, 2001). Em curto período (1 a 2 minutos) ocorre equilíbrio entre a concentração de glicose nos canais laterais e no espaço intracelular; no entanto, por conta da perda de fluidez, a base das células é mantida encolhida enquanto houver glicose na mucosa (PAPPERHEIMER; VOLPP, 1992; NUSRAT; TURNER; MADARA, 2000).

Em resumo, o transporte de aminoácidos com a presença de glicose ocorre diretamente, através das junções apertadas, e indiretamente, através da membrana apical, pelos co-transportadores dependentes de sódio. E, ainda, o tempo que o substrato é transportado pela via intercelular é de, aproximadamente, 20 segundos, enquanto, pela via transcelular, é em torno de 2 a 3 minutos (PAPPERHEIMER, 2001). Enquanto isso, a ausência de glicose permite a passagem dos aminoácidos predominantemente através da via transcelular (KELLET, 2001). O presente estudo confirma estes autores, uma vez que a absorção de glutamina sem a presença de glicose é 19% e 29% menor do que com a presença de glicose, nos grupos controle e endotoxemia, respectivamente, aos 120 minutos de incubação.

Por outro lado, em condições de sepse ou endotoxemia, ocorre uma disfunção no tecido intestinal, que é o “estopim” para o desenvolvimento da falência múltipla de órgãos (FMO) (FINK, 1990), principal causa de morte decorrente da sepse (ANGUS *et al.*, 2001). Isso acontece porque o intestino é o maior reservatório de bactérias e o vazamento destas, ou de produtos microbianos, para o interior do organismo induz a iniciação ou a amplificação de resposta deletéria inflamatória e FMO (FINK, 1990; YANG *et al.*, 2009).

Em roedores, quando é injetado LPS via intraperitoneal, a função da barreira intestinal é prejudicada, causando hiperpermeabilidade e translocação bacteriana (HAN *et al.*, 2004). Entretanto, quando é administrado por via oral, o LPS falha em induzir disfunção na barreira intestinal, indicando que as células epiteliais não respondem diretamente à exposição ao LPS (TAMAI *et al.*, 2002). A patogênese da disfunção na barreira intestinal em animais endotêmicos é mediada, pelo menos em parte, por óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), TNF- α e proteína de alta mobilidade box-1 (*high-mobility group box 1* – HMGB-1) (HAN *et al.*, 2004; SAPPINGTON *et al.*, 2002). Ácidos biliares, contendo altas concentrações de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-6, HMGB-1), são uma resposta à presença de LPS (ULLOA *et al.*, 2002), o que modula a função da barreira intestinal (JACKSON; DAÍ; SEWELL, 2000; CLARKE *et al.*, 2006; ROUHIAINEN *et al.*, 2007). Apesar de mais estudos serem necessários para investigar o papel da bile na disfunção intestinal, Yang e colaboradores

(2009) verificaram que o aumento na permeabilidade intestinal e na translocação bacteriana foi revertido após remoção da HMGB-1 em ratos.

Apesar de, em condições de endotoxemia, haver maior permeabilidade intestinal, os resultados do presente estudo indicaram que a absorção de glutamina é maior em animais saudáveis do que nos submetidos ao LPS, independente da presença de glicose. Sabe-se que a glutamina é um dos principais substratos para o intestino (SALVALAGGIO; CAMPOS, 2000) e parte deste aminoácido proveniente da suplementação é retida pelo próprio tecido intestinal (RHOADS *et al.*, 1997; ADIBI, 2003). Nossos resultados vão ao encontro destas afirmações, sobretudo em condições de endotoxemia na presença de glicose.

A glutamina é um aminoácido que serve de substrato energético para células de divisão rápida, como os enterócitos, e tem papel fundamental na manutenção da integridade do tecido intestinal (WINDMULLER; SPAETH, 1980). Além do mais, a glutamina reduz citocinas inflamatórias, bem como a ativação do NFκB, e proporciona a síntese de GSH e de HSP que protegem os enterócitos de injúrias, reduzindo risco de apoptose celular (WISCHMEYER, 2005; SINGLETON; BECKEY; WISHMEYER, 2005; FUCHS; BODE, 2006). Neste sentido, estudos têm demonstrado que a suplementação de glutamina preserva a permeabilidade intestinal após situações de estresse, como a obstrução intestinal (MARGARITIS *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2010) e a síndrome do intestino irritável (WALD; RAKEL, 2008). E, ainda, Sakiyama e colaboradores (2009) demonstraram, nas células intestinais de ratos e humanos, que, em condições de estresse fisiológico, a glutamina induz a autofagia através da inibição das vias da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamicine* - mTOR) e p38^{MAPK}. A autofagia é reconhecidamente um mecanismo de sobrevivência celular, em que proteínas citoplasmáticas e organelas não essenciais provêm uma fonte alternativa de geração de energia (TANIDA *et al.*, 2005; SAKIYAMA *et al.*, 2009). Estes fatos justificam a maior retenção de glutamina em frações intestinais, em meio com glicose, de animais submetidos à endotoxemia pós-suplementação.

Outro mecanismo que explica a maior retenção tecidual de glutamina na presença de glicose é a via da hexosamina. O metabolismo celular da glicose gera glicose-6-fosfato (glicose-6-P), que é convertida em glicogênio, frutose-6-fosfato ou ainda segue para via das pentoses. O aumento da concentração de glicose no meio induz a síntese de glicogênio, enquanto a maior disponibilidade de glutamina induz a síntese da enzima glutamina-frutose-6-fosfato amidotransferase (*glutamine:fructose-6-phosphato amidotransferase* - GFAT) e, conseqüentemente, promove maior formação de glicosamina (MARSHALL; BACOTE; TRAXINGER, 1991). A adição de um grupo acetil, assim como uma molécula de uridina trifosfato

(UTP), gera uridina difosfato *N*-acetilglicosamina (UDP-*N*-acetilglicosamina). Esta é responsável pela síntese de proteínas citoplasmáticas, como glicoproteínas, glicolípídios e proteoglicanas, e, ao ser metabolizada pela enzima uridina difosfato-*N*-acetilglicosamina: peptídeo β -*N*-acetilglicosaminil transferase (*uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide β -N-acetylglucosaminyl transferase* – OGT), catalisa o-*N*-Ac-glicosamina (O-linked β -*N*-acetylglucosamine – O-GlcNac), ativando a produção de HSF-1 e, conseqüentemente, de HSP (SINGLETON, WISCHMEYER, 2008; KAZEMI *et al.*, 2010). Além da síntese de proteínas citoplasmáticas citadas acima, a UDP-*N*-acetilglicosamina inibe a enzima glicogênio sintase quinase 3 beta (*glycogen synthase kinase 3 beta* - GSK3 β), cuja qual inativa a enzima glicogênio sintase, permitindo, assim, maior síntese de glicogênio (PETRY *et al.*, 2012) (**Figura 21**). Este é um dos mecanismos que explicam a maior captação de glutamina pelo tecido submetido à endotoxemia na presença de glicose, uma vez que as HSP têm papel fundamental na sobrevivência celular em condições de estresse metabólico, como é o caso da sepse (SINGLETON, WISCHMEYER, 2008). No entanto, mais estudos são necessários para confirmar a importância desta via nestas condições.

Abreviaturas: P = fosfato; NAD = nicotinamida adenina dinucleotídeo; 6-PGDH = 6-fosfogluconato desidrogenase; G6PDH = glicose-6-fosfato desidrogenase; ATP = adenosina trifosfato; ADP = adenosina difosfato; Pi = fosfato inorgânico; G6PI = glicose-6-fosfato; GFAT = glutamina-frutose-6-fosfato amidotransferase; PFK = fosfofrutoquinase; PGmutase = fosfoglicerato mutase; UTP = uridina trifosfato; PPi – pirofosfato; UDP = uridina difosfato; GS = glicogênio sintase; CoA-SH = coenzima A; OGT = uridina difosfato-*N*-acetilglicosamina: peptídeo β -*N*-acetilglicosaminil transferase; GSK-3 β = glicogênio sintase quinase 3 beta; HSF-1 = fator de choque térmico-1; HSP70 = proteína de choque térmico de 70 kDa; ciclo TCA = ciclo do ácido cítrico.

As setas largas indicam o percurso na presença de glicose e glutamina.

Figura 21. Esquema proposto da via metabólica da hexosamina na presença de glicose e glutamina.

Fonte: adaptado de MARSHALL; BACOTE; TRAXINGER, 1991; KAZEMI *et al.*, 2010, PETRY *et al.*, 2012.

Já nas frações intestinais em meio sem glicose, a retenção de glutamina no tecido intestinal não apresentou diferença estatística em todos os tempos entre controle e endotoxemia; apenas em 120 minutos a retenção tecidual foi maior no grupo controle. Estes resultados demonstram a importância da presença da glicose no lúmen intestinal, proporcionando o adequado funcionamento do tecido submetido à endotoxemia. Além da ausência de glicose no lúmen, nesta condição é comum ocorrer quadro de hipoglicemia devido à maior captação de glicose por outros tecidos, como muscular e hepático (HARIZI *et al.*, 2007). Na presença de LPS, o TNF- α é a citocina que tem papel fundamental no estímulo à captação de glicose por tecidos; no entanto, a sua neutralização não bloqueia a alteração no metabolismo do carboidrato (BAGBY *et al.*, 1993). Assim, outras citocinas, como a interleucina 1 (IL-1) e a interleucina 6 (IL-6), também têm sido estudadas na contribuição para o quadro de hipoglicemia na endotoxemia (DEL REY; BESEDOVSKY, 1992; TWEEDELL *et al.*, 2011). Neste estudo, a ausência de glicose associada à endotoxemia proporcionou menor captação de glutamina pelo tecido intestinal.

Apesar da maior retenção tecidual de glutamina em condições de endotoxemia em relação ao controle, sobretudo em meio com glicose, a maior parte do aminoácido consegue alcançar a corrente sanguínea (serosa). A comparação entre os compartimentos (serosa e tecido) mostrou que 56 a 57% do aminoácido são absorvidos, enquanto 44 a 43% são retidos no tecido intestinal, com e sem glicose, respectivamente. De qualquer forma, o percentual de unidades de glutamina retido no tecido intestinal é relevante e deve ser levado em conta na definição do objetivo da suplementação de glutamina. Isso justifica, pelo menos em parte, a controvérsia nos estudos em relação ao efeito da suplementação de glutamina através das vias oral ou enteral (MCCLAVE *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que:

- 1) A absorção de glutamina é dose e tempo dependente e somente em altas concentrações é maior do que a retenção no tecido intestinal. Assim, a utilização da suplementação de glutamina na forma livre tem efeito principalmente em restaurar funções intestinais. Tal fato deve ser levado em conta na hora de optar pela sua suplementação, uma vez que outras estratégias menos onerosas podem ser utilizadas em seu lugar.
- 2) Além disso, conclui-se que, em condições de endotoxemia, ocorrem alterações na cinética de absorção de glutamina, decorrentes da disfunção no tecido intestinal. Nestas condições, a presença de glicose aumenta a captação de glutamina pelo tecido intestinal, o que pode ser explicado possivelmente pela via das hexosaminas; no entanto, são necessárias maiores investigações em relação ao mecanismo pelo qual isso ocorre. E, ainda, estudos de compartimentalização da suplementação de glutamina marcada com carbono 14 em animais ou isótopos em humanos elucidariam a cinética de absorção deste aminoácido *in vivo*.

8. PERSPECTIVAS

Após realização deste estudo, outras perguntas vieram à tona e merecem atenção em outros projetos de pesquisa. O estudo dos sistemas de transporte de glutamina independentes de sódio no enterócito trará informações mais precisas em relação ao transporte e à absorção do aminoácido. Além disso, os mecanismos pelo qual ocorre maior captação de glutamina pelo tecido na presença de glicose, em condições de endotoxemia, necessitam maiores investigações. É de fundamental importância, para se compreender o metabolismo deste aminoácido, a identificação dos metabólitos da glutamina no intestino e os que são liberados para corrente sanguínea, através da cromatografia líquida de alta eficiência (*high-performance liquid chromatography* - HPLC).

9. REFERÊNCIAS

ADIBI, S.A.; MERCER, D.W. Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. **Journal of Clinical Investigation**, v.52, p.1586-1594, 1973.

ADIBI, S.M. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.285, p.G779-G88, 2003.

ALBERTI, C.; BRUN-BUISSON, C.; BURCHARDI, H.; MARTIN, C.; GOODMAN, S.; ARTIGAS, A.; SICIGNANO, A.; PALAZZO, M.; MORENO, R.; BOULME, R.; LEPAGE, E.; LE GALL, R. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive Care Medicine**, v.28, p.108-121, 2002.

AL-MAHROOS, F.T.; ABUMRAD, N.; GHISHAN, F.K. Developmental changes in glutamine transport by rat jejunal basolateral membrane vesicles. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.194, p.186-192, 1990.

ANDREASEN, A.S.; PEDERSON-SKOVSGAARD, T.; MORTENSEN, O.H.; VAH HALL, G.; MOSELEY, P.L.; PEDERSEN, B.K. The effect of glutamine infusion on the inflammatory response and HSP70 during human experimental endotoxaemia. **Critical Care**, v.13, n.1, p.R7-R14, 2009.

ANGUS, D.C.; LINDE-ZWIRBLE, W.T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v.29, p.1303-1310, 2001.

ARGENZIO, R.A.; RHOADS, J.M.; ARMSTRONG, M.; GOMEZ, C. Glutamine stimulates prostaglandin sensitive Na(+)-H⁺ exchange in experimental porcine cryptosporidiosis. **Gastroenterology**, v.106, p.1418-1428, 1994.

AUSTGEN, T.R.; CHEN, M.K.; MOORE, W.; SOUBA, W.W. Endotoxin and renal glutamine metabolism. **Archives of Surgery**, v.126, p.23-27, 1991a.

AUSTGEN, T.R.; CHEN, M.K.; DUDRICK, P.S.; COPELAND, E.M.; SOUBA, W.W. Cytokine regulation of intestinal glutamine utilization. **American Journal of Surgery**, v.163, p.174-180, 1991b.

AUSTGEN, T.R.; CHAKRABARTI, R.; CHEN, M.K.; SOUBA, W.W. Adaptive regulation in skeletal muscle glutamine metabolism in endotoxin-treated rats. **Journal of Trauma**, v.32, p.600-607, 1992.

BAGBY, G.J.; LANG, C.H.; SKREPNIK, N.; GOLIGHTLY, G.; SPITZER, J.J. Regulation of glucose metabolism after endotoxin and during infection is largely independent of endogenous tumor necrosis factor. **Circulatory Shock**, v.39, p.211-219, 1993.

BAI, J.P. Distribution of brush-border membrane peptidases along the rat intestine. **Pharmaceutical Research**, v.11, p.897-900, 1994.

BEUTLER, B.; HOEBE, K.; DU, X.; ULEVITCH, R.J. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. **Journal of Leukocyte Biology**, v.74, p.479-485, 2003.

BIOLO, G.; TOIGO, G.; CIOCCHI, B.; SITULIN, R.; ISCRA, F.; GULLO, A.; GUARNIERI, G. Metabolic response to injury and sepsis: changes in protein metabolism. **Nutrition**, v.13, p.52S-57S, 1997.

BOELEN, P.G.; MELIS, G.C.; VAN LEEUWEN, P.A.; TEM HAVE, G.A.; DEUTZ, N.E. Route of administration (enteral or parenteral) affects the contribution of L-glutamine to de novo l-arginine synthesis in mice: a stable-isotope study. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.291, p.E683-E690, 2006.

BOELEN, P.G.; VAN LEEUWEN, P.A.; DEJONG, H.C.; DEUTZ, N.E. Intestinal renal metabolism of L-citrulline and L-arginine following enteral or parenteral infusion of L-alanyl-L-[2,¹⁵N] glutamine or L-[2,¹⁵N] glutamine in mice. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.289, p.G679-G685, 2005.

BONE, R.C.; BALK, R.A.; CERRA, F.B.; DELLINGER, R.P.; FEIN, A.M.; KNAUS, W.A.; SCHEIN, R.M.; SIBBALD, W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v.101, p.1644-1655, 1992.

BORBA-MURAD, G.R.; SOUZA, H.M.; FERREIRA, E.B.; DAMBROSO, D.; BAZZOTE, R.B. Changes in glycemia induced by exercise in rats: contribution of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v.102, p.113-23, 1998.

BOVERIS, A.; ALVAREZ, S.; NAVARRO, A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. **Free Radical Biology & Medicine**, v.33, p.1186-1193, 2002.

BOZA, J.J.; MOENNOZ, D.; BOURNOT, C.E.; BLUM, S.; ZBINDEN, I.; FINOT, P.A.; BALLEVRE, O. Role of glutamine on the de novo purine nucleotide synthesis in Caco-2 cells. **European Journal of Nutrition**, v.39, p.38-46, 2000a.

BOZA, J.J.; MAIRE, J.C.; BOVETTO, L.; BALLEVRE, O. Plasma glutamine response to enteral administration of glutamine in human volunteers. **Nutrition**, v.16, p.1037-1042, 2000b.

BRACCO, D. Glutamine: a double edged sword in the intensive care unit? **Critical Care Medicine**, v.33, p.2692-2694, 2005.

BROER, S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. **Physiological Reviews**, v.88, p.249-86, 2008.

BROSNAN, J. Amino acids, then and now – a reflection on sir Hans Krebs' contribution to nitrogen metabolism. **IUBMB Life**, v.52, n.6, p.265-270, 2001.

BRUINS, M.J.; SOETERS, P.B.; DEUTZ, N.E. Endotoxemia affects organ protein metabolism differently during prolonged feeding in pigs. **Journal of Nutrition**, v.130, p.3003-3013, 2000.

CANI, P.D.; BIBILONI, R.; KNAUF, C.; WAGET, A.; NEYRINCK, A.M.; DELZENNE, N.M.; BURCELIN, R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v.57, p.1470-1481, 2008.

CHRISTENSEN, H.N. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. **Physiological Reviews**, v.70, p.43-77, 1990.

CLARKE, D.L.; PILLAY, Y.; ANDERSON, F.; THOMSON, S.R. The current standard of care in the periprocedural management of the patient with obstructive jaundice. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v.88, p.610-616, 2006.

COEFFIER, M.; CLAEYSSSENS, S.; HECKETSWEILLER, B.; LAVOINNE, A.; DUCROTTE, P.; DECHELOTTE, P. Enteral glutamine stimulates protein synthesis and decreases ubiquitin mRNA level in human gut mucosa. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.285, p.G266-G273, 2003.

COONEY, R.N.; KIMBALL, S.R.; VARY, T.C. Regulation of skeletal muscle protein turnover during sepsis: mechanisms and mediators. **Shock**, v.7, p.1-16, 1997.

CROSET, M.; RAJAS, F.; ZITOUN, C.; HUROT, J.M.; MONTANO, S.; MITHIEUX, G. Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. **Diabetes**, v.50, p.740-746, 2001.

CRUZAT, V.F.; ROGERO, M.M.; BORGES, M.C.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.13, p.336-342, 2007.

CRUZAT, V.F.; ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Effects of supplementation with free glutamine and the dipeptide alanyl-glutamine on parameters of muscle damage and inflammation in rats submitted to long duration exercise. **Cell Biochemistry and Function**, v.28, p.24-30, 2010.

CRUZAT, V.F.; TIRAPEGUI, J. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. **Nutrition**, v.25, p.428-435, 2009.

CURI, R. **Glutamina**: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. 261p.

CURI, R.; LAGRANHA, C.J.; DOI, S.Q.; SELLITTI, D.F.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T.C.; CORLESS, M.; NEWSHOME, P. Molecular mechanisms of glutamine action. **Journal of Cellular Physiology**, v.204, p.392-401, 2005a.

CURI, R.; LAGRANHA, C.J.; DOI, S.Q.; SELLITTI, D.F.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T.C. Glutamine-dependent changes in gene expression and protein activity. **Cell Biochemistry and Function**, v.23, p.77-84, 2005b.

CURI, R.; NEWSHOLME, P.; PITHON-CURI, T.C.; PIRES-DE-MELO, M.; GARCIA, C.; HOMEM-DE-BITTENCOURT Jr., P.I.; GUIMARAES, A.R. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p.15-21, 1999.

CURI, T.C.; MELO, M.P.; AZEVEDO, R.B.; ZORN, T.M.; CURI, R. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v.272, p.C1124-1129, 1997.

CURTHOYS, N.P.; WATFORD, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. **Annual Review of Nutrition**, v.15, p.133-159, 1995.

DÉCHELOTTE, P.; DARMAUN, D.; RONGIER, M.; HECKETWEILER, B.; RIGAL, O.; DESJEUX, J.F. Absorption and metabolic effects of enterally administered glutamine in humans. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.260, p.G677-G682, 1991.

DÉCHELOTTE, P.; HASSELMANN, M.; CYNOBER, L.; ALLAOUCHICHE, B.; COEFFIER, M.; HECKETSWEILER, B.; MERLE, V.; MAZEROLLES, M.; SAMBA, D.; GUILLOU, Y.M.; PETIT, J.; MANSOOR, O.; COLAS, G.; COHENDY, R.; BARNOUD, D.; CZERNICHOW, P.; BLEICHNER, G. L-alanyl-L-glutamine dipeptide-supplemented total parenteral nutrition reduces infectious complications and glucose intolerance in critically ill patients: the French controlled, randomized, double-blind, multicenter study. **Critical Care Medicine**, v.34, p.598-604, 2006.

DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H.O. Metabolic and neuroendocrine effects of pro-inflammatory cytokines. **European Journal of Clinical Investigation**, v.22, p.10-15, 1992.

DEVES, R.; BOYD, C.A. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure and function. **Physiological Reviews**, v.78, p.487-545, 1998.

DIOGUARDI, F.S. Clinical use of amino acids as dietary supplement: pros and cons. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v.2, n.2, p.75-80, 2011.

DUDRICK, P.S.; BLAND, K.I.; SOUBA, W.W. Effects of tumor necrosis factor on system ASC-mediated glutamine transport by human fibroblasts. **Journal of Surgical Research**, v.52, n.4, p.347-352, 1992.

EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. **Science**, v.130, p.432-437, 1959.

FEI, Y.J.; KANAI, Y.; NUSSBERGER, S.; GANAPATHY, V.; LEIBACH, F.H.; ROMERO, M.F.; SINGH, S.K.; BORON, W.F.; HEDIGER, M.A. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. **Nature**, v.398, p.563-566, 1994.

FINFER, S.; BELLOMO, R.; LIPMAN, J.; FRENCH, C.; DOBB, G.; MYBURGH, J. Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. **Intensive Care Medicine**, v.30, p.589-596, 2004.

FINK, M.P. Leaky gut hypothesis: a historical perspective. **Critical Care Medicine**, v.18, p.579-80, 1990.

FLÄRING, U.B.; ROOYACKERS, O.E.; WERNERMAN, J.; HAMMARQVIST, F. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. **Clinical Science**, v.104, p.275-282, 2003.

FUCHS, B.C.; BODE, B.P. Stressing out over survival: glutamine as an apoptotic modulator. **Journal of Surgical Research**, v.131, p.26-40, 2006.

FUENTES-OROZCO, C.; ANAYA-PRADO, R.; GONZALEZ-OJEDA, A.; ARENAS-MÁRQUES, H.; CABRERA-PIVARAL, C.; CAREVANTES-GUEVARRA, G.; BARRERA-ZEPEDA, L.M. L-alanyl-L-glutamine-supplemented parenteral nutrition improves infectious morbidity in secondary peritonitis. **Clinical Nutrition**, v.23, p.13-21, 2004.

GARLICK, P.J. Assessment of the safety of glutamine and other amino acids. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2556S-2561S, 2001.

GARREL, D.R.; PATENAUDE, J.; NEDELEC, B.; SAMSON, L.; DORAIS, J.; CHAPOUX, J.; D'ELIA, M.; BERNIER, J. Decreased mortality and infectious morbidity in adult burn patients given enteral glutamine supplements: a prospective, controlled, randomized clinical trial. **Critical Care Medicine**, v.31, p.2444-2449, 2003.

GATH, I.; CLOSS, E.I.; GODTEL-ARMBRUST, U.; SCHMITT, S.; NAKANE, M.; WESSLER, I.; FORSTERMANN, U. Inducible NO synthase II and neuronal NO synthase I are constitutively expressed in different structures of guinea pig skeletal muscle: implications for contractile function. **FASEB Journal**, v.10, p.1614-1620, 1996.

GILBERT, E. R.; WONG, E. A.; WEBB, K. E. Peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. **Journal of Animal Science**, v.86, p.2125-2155, 2008.

GOETERS, C.; WENN, A.; MERTES, N.; VAN AKEN, H.; STEHLE, P.; BONE, H.G. Parenteral L-alanyl-L-glutamine improves 6-month outcome in critically ill patients. **Critical Care Medicine**, v.30, p.2032-2037, 2002.

GORE, D.C.; WOLFE, R.R. Glutamine supplementation fails to affect muscle protein kinetics in critically ill patients. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.26, p.342-350, 2002.

GRIFFITHS, R.D.; JONES, C.; PALMER, T.E. Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition. **Nutrition**, v.13, p.295-302, 1997.

HALL, J.C.; DOBB, G.; HALL, J.; SOUSA, R.; BRENNAN, L.; McCAULEY, R. A prospective randomized trial of enteral glutamine in critical illness. **Intensive Care Medicine**, v.29, p.1710-1716, 2003.

HAMIEL, C.R.; PINTO, S.; HAU, A.; WISCHMEYER, P.E. Glutamine enhances heat shock protein 70 expression via increased hexosamine biosynthetic pathway activity. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v.297, p.C1509-C1519, 2009.

HAN, X.; FINK, M.P.; YANG, R.; DELUDE, R.L. Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. **Shock**, v.21, p.G126-G136, 2004.

HANKARD, R.G.; HAYMOND, M.W.; DARMAUN, D. Role of glutamine as a glucose precursor in fasting humans. **Diabetes**, v.46, p.1535-1541, 1997.

HARIZI, H.; HOMO-DELARCHE, F.; AMRANI, A.; COULAUD, J.; MORMÈDE, P. Marked genetic differences in the regulation of blood glucose under immune and restraint stress in mice reveals a wide range of corticosenstivity. **Journal of Neuroimmunology**, v.189, p.59-68, 2007.

HAUSSINGER, D. Liver glutamine metabolism. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.14, p.56S-62S, 1990.

HAUSSINGER, D.; GRAF, D.; WEIERGRABER, O.H. Glutamine and cell signaling in liver. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2509S-2514S, 2001.

HERSKOWITZ, K.; BODE, B.P.; BLOCK, E.R.; SOUBA, W.W. The effects of endotoxin on glutamine transport by pulmonary artery endothelial cells. **Journal of Surgery Research**, v.50, p.356-361, 1991.

HEYLAND D.K.; DHALIWAL, R.; DROVER, J.W.; GRAMLICH, L.; DODEK, P. Canadian critical care clinical practice guidelines committee. Canadian clinical practice guidelines for nutrition support in mechanically ventilated, critically ill adult patients. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.27, p.355-373, 2003.

HICKSON, R.C.; CZERWINSI, S.M.; WEGRZYN, L.E. Glutamine prevents downregulation of myosin heavy chain synthesis and muscle atrophy from glucocorticoids. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.268, n.4, pt.1, p.E730-E734, 1995.

HORVATH, K.; JAMI, M.; HILL, I.D.; PAPADIMITRIOU, J.C.; MAGDER, L.S.; CHANASONGCRAM, S. Isocaloric glutamine-free diet and the morphology and function of rat intestine. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.20, p.128-134, 1996.

HUANG, Y.F.; WANG, Y.; WATFORD, M. Glutamine directly downregulates glutamine synthetase protein levels in mouse C2C12 skeletal muscle myotubes. **Journal of Nutrition**, v.137, p.1357-1362, 2007.

INOUE, Y.; PACITTI, A.J.; SOUBA, W.W. Endotoxin increases hepatic glutamine transport activity. **Journal Surgical Research**, v.54, p.393-400, 1993.

ISENMAN, L.; LIEBOW, C.; ROTHMAN, S. The endocrine secretion of mammalian digestive enzymes by exocrine glands. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.276, p.E223-E232, 1999.

JACKSON, G.D.F.; DAI, Y.; SEWELL, W.A. Bile mediates intestinal pathology in endotoxemia in rats. **Infection and Immunity**, v.68, p.4714-4619, 2000.

JOHNSON, R.W. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1244-1255, 1997.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal**, v.11, p.447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 542p.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983, 124p.

KARINCH, A.M.; PAN, M.; LIN, C.; STRANGE, R.; SOUBA, W.W. Glutamine metabolism in sepsis and infection. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2535S-2538S, 2001.

KAZEMI, Z.; CHANG, H.; HASERODT, S.; McKEN, C.; ZACHARA, N.E. O-Linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) regulates stress-induced heat shock protein expression in a GSK-3 β -dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v.285, p.39096-39107, 2010.

KELLET, J.L. The facilitated component of intestinal glucose absorption. **Journal of Physiology**, v.531, pt.3, p.585-595, 2001.

KLASSEN, P.; MAZARIEGOS, M.; SOLOMONS, N.W.; FÜRST, P. The pharmacokinetic responses of human to 20 g of alanyl-glutamine dipeptide differ with the dosing protocol but not with gastric acidity or in patients with acute dengue fever. **Journal of Nutrition**, v.130, p.177-182, 2000.

KREBS, H.A. Metabolism of amino acids. IV. The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. **Biochemical Journal**, v.29, p.1951-1968, 1935.

KREBS, H.A.; HENSELEIT, K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie**, v.210, p.33-66, 1932.

KREYMAN, K.G. German society for nutritional medicine and European Society for parenteral and enteral nutrition. ESPEN Guidelines on enteral nutrition: intensive care. **Clinical Nutrition**, v.25, p.210-223, 2006.

LABOW, B.I.; SOUBA, W.W.; ABCOUWER, S.F. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism - glutaminase and glutamine synthetase. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2467S-2474S, 2001.

LACEY, J.M.; WILMORE, D.W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutrition Reviews**, v.48, p.297-309, 1990.

LAVOINNE, A.; HUSSON, A.; QUILLARD, M.; CHEDEVILLE, A.; FAIRAND, A. Glutamine inhibits the lowering effect of glucose on the level of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in isolated rat hepatocytes. **European Journal of Biochemistry**, v.242, p.537-543, 1996.

LEVINE, R.R.; MCNARY, W.F.; KORNGUTH, P.J.; LEBLANC, R. Histological reevaluation of everted gut technique for studying intestinal absorption. **European Journal of Pharmacology**, v.9, p.211-219, 1970.

LEVY, M.M.; FINK, M.P.; MARSHALL, J.C.; ABRAHAM, E.; ANGUS, D.; COOK, D.; COHEN, J.; OPAL, S.M.; VINCENT, J.L.; RAMSAY, G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical Care Medicine**, v.31, n.4, p.1250-1256, 2003.

LIANG, M.; WANG, X.; YUAN, Y.; ZHOU, Q.; TONG, C.; JIANG, W. Different effect of glutamine on macrophage tumor necrosis factor- α release and heat shock protein 72 expression *in vitro* and *in vivo*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.41, n.2, p.171-177, 2009.

LIANG, S.L.; CARLSON, G.C.; COULTER, D.A. Dynamic regulation of synaptic GABA release by the glutamate-glutamine cycle in hippocampal area CA1. **Journal of Neuroscience**, v.26, p.8537-8548, 2006.

LIGTHART-MELIS, G.C.; VAN DE POLL, M.C.G.; DEJONG, C.H.C.; BOELEN, P.G.; DEUTZ, N.E.P.; VAN LEEUWEN, P.A.M. The route of administration (enteral or parenteral) affects the conversion of isotopically labeled L-[2- 15 N] glutamine into citrulline and arginine in humans. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.31, p.343-350, 2007.

LUKASZEWICZ, G.; ABCOUWER, S.; LABOW, B.; SOUBA, W.W. Glutamine synthetase gene expression in the lungs of endotoxin-treated and adrenalectomized rats. **Source: American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.273, n.6, p.L1182-L1190, 1997.

MacBURNEY, M.; YOUNG, L.S.; ZIEGLER, T.R.; WILMORE, D.W. A cost-evaluation of glutamine-supplemented parenteral nutrition in adult bone marrow transplant patients. **Journal of the American Dietetic Association**, v.94, p.1263-1266, 1994.

MAENZ, D.D.; CHENU, C.; BRETON, S.; BERTELOOT, A. pH-dependent heterogeneity of acidic amino acid transport in rabbit jejunal brush border membrane vesicles. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.3, p.1510-1516, 1992.

MAHOMOODALLY, M.F.; GURIB-FAKIM, A.; SUBRATTY, A.H. Effect of exogenous ATP on *Momordica charantia* Linn. (Cucurbitaceae) induced inhibition of D-glucose, L-tyrosine and fluid transport across rat everted intestinal sacs *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.257-263, 2007.

MANCO, M. Endotoxin as a missed link among all the metabolic abnormalities in the metabolic syndrome. **Atherosclerosis**, v.206, p.36, 2009.

MANCO, M.; PUTIGNANI, L.; BOTTAZZO, G.F. Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk. **Endocrine Reviews**, v.31, p.817-844, 2010.

MARGARITIS, V.G.; FILOS, K.S.; MICHALAKI, M.A.; SCOPA, C.D.; SPILIOPOULOU, I.; NIKILOPOULOU, V.N.; VAGIANOS, C.E. Effect of oral glutamine administration on bacterial translocation, endotoxemia, liver and ileal morphology, and apoptosis in rats with obstructive jaundice. **World Journal of Surgery**, v.29, p.1329-1334, 2005.

MARSHALL, S.; BACOTE, V.; TRAXINGER, R.R. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system - role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.4706-4712, 1991.

MARTIN, G.S.; MANNINO, D.M.; EATON, S.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **New England Journal of Medicine**, v.348, p.1546-1554, 2003.

MARTIN, G.; FERRIER, B.; CONJARD, A.; MARTIN, M.; NAZARET, R.; BOGHOSSIAN, M.; SAADÉ, F.; MANCUSO, C.; DUROZARD, D.; BAVEREL, G. Glutamine gluconeogenesis in the small intestine of 72 h-fasted adult rats is undetectable. **Biochemical Journal**, v.401, p.465-473, 2007.

MARY, P.L.; RAO, P. Phenol red inhibits uptake of phosphate by the everted gut sacs of mice. **Kobe Journal of Medical Sciences**, v.48, n.1/2, p.59-62, 2002.

MCCLAVE, S.A.; MARTINDALE, R.G.; VANEK, V.W.; MCCARTHY, M.; ROBERTS, P.; TAYLOR, B.; OCHOA, J.B.; NAPOLITANO, L.; CRESCI, G.; A.S.P.E.N. BOARD OF DIRECTORS; AMERICAN COLLEGE OF CRITICAL CARE MEDICINE. Guidelines for the provision and assessment of nutrition support therapy in the adult critically ill patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.). **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.33, p.277-316, 2009.

MILLER, M.A.; CAPPUCIO, F.P. Endotoxin and metabolic syndrome. **Atherosclerosis**, v.206, p.37, 2009.

MITHIEUX, G.; BADY, I.; GAUTIER, A.; CROSET, M.; RAJAS, F.; ZITOUN, C. Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.286, p.E370-E375, 2004.

MITHIEUX, G.; MISERY, P.; MAGNAN, C.; PILLOT, B.; GAUTIER-STEIN, A.; BERNARD, C.; RAJAS, F.; ZITOUN, C. Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. **Cell Metabolism**, v.2, p.321-329, 2005.

MORRIS Jr., S.M.; BILLIAR, T.R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.266, p.E829-E839, 1994.

MUNCK, B.G.; MUNCK, L.K. Effects of pH changes on systems ASC and B in rabbit ileum. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.276, p.G173-G184, 1999.

MUNCK, L.K.; GRONDAHL, M.L.; THORBOLL, J.E.; SKADHAUGE, E.; MUNCK, B.G. Transport of neutral, cationic and anionic amino acids by systems B, b⁰⁺, X_{AG}, and ASC in swine small intestine. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.126, p.527-537, 2000.

MUNCK, L.K.; MUNCK, B.G. Amino acid transport in the small intestine. **Physiological Research**, v.43, p.335-345, 1994.

NEU, J.; SHENOY, V.; CHAKRABARTI, R. Glutamine nutrition and metabolism: where do we go from here? **FASEB Journal**, v.10, p.829-837, 1996.

NEWSHOLME, E.A.; CRABTREE, B.; ARDAWI, M.S. Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemical, physiological and clinical importance. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v.70, p.473-489, 1985.

NEWSHOLME, E.A.; NEWSHOLME, P.; CURI, R.; CRABTREE, B.; ARDAWI, S.M. Glutamine metabolism in different tissues: its physiological importance. In: KINNEY, J.M.; BORUM, P.G., eds. **Perspectives in clinical nutrition**. Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1989. p.71-98.

NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, post-injury, surgery or infection? **Journal of Nutrition**, v.131, p.2515S-2522S, 2001.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M.M.R.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T.C.; DOI, S.Q.; BAZOTTE, R.B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.153-163, 2003a.

NEWSHOLME, P.; PROCOPIO, J.; LIMA, M.M.R.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, R. Glutamine and glutamate - their central role in cell metabolism and function. **Cell Biochemistry and Function**, v.21, p.1-9, 2003b.

NGUYEN, H.B.; RIVERS, E.P.; ABRAHAMIAN, F.M.; MORAN, G.J.; ABRAHAM, E.; TRZECIAK, S.; HUANG, D.T.; OSBORN, T.; STEVENS, D.; TALAN, D.A.; EMERGENCY DEPARTMENT SEPSIS EDUCATION PROGRAM AND STRATEGIES TO IMPROVE SURVIVAL (ED-SEPSIS) WORKING GROUP Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. **Annals of Emergency Medicine**, v.48, n.1, p.28-54, 2006.

NIU, L.; QIAO, W.; LI, G.; LI, Q.; HUANG, Q.; GONG, J.; ZHU, W.; LI, N.; LI, J. Different alterations in rat intestinal glutamine transport during the progression of CLP- and LPS-induced sepsis. **Journal of Surgical Research**, v.169, p.284-291, 2011.

NOVAK, F.; HEYLAND, D.K.; AVENELL, A.; DROVER, J.W.; SU, X. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. **Critical Care Medicine**, v.30, p.2022-2029, 2002.

NUSRAT, A.; TURNER, J.R.; MADARA, J.L. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines and immune cells. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.279, n.5, p.G851-G857, 2000.

O'KEEFE, S.J.D.; LEE, R.B.; ANDERSON, F.P.; GENNINGS, C.; ABOU-ASSI, S.; CLORE, J.; HEUMAN, D.; CHEY, W. Physiological effects of enteral and parenteral feeding on pancreaticobiliary secretion in humans. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.284, p.G27-G36, 2003.

OLIVEIRA, G.P.; DIAS, C.M.; PELOSI, P.; ROCCO, P.R.M. Understanding the mechanisms of glutamine action in critically ill patients. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, p.417-430, 2010.

PADKIN, A.; GOLDFRAD, C.; BRADY, A.R.; YOUNG, D.; BLACK, N.; ROWAN, K. Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. **Critical Care Medicine**, v.31, p.2332-2338, 2003.

PALSSON-MCDERMOTT, E.M.; O'NEILL, L.A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. **Immunology**, v.113, p.153-162, 2004.

PAPENHEIMER, J.R.; VOLPP, K. Transmucosal impedance of small intestine: correlation with transport of sugars and amino acids. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v.263, n.2, pt.1, p.C480-C493, 1992.

PAPENHEIMER, L.R. Intestinal absorption of hexoses and amino acids: from apical cytosol to villus capillaries. **Journal of Membrane Biology**, v.184, p.233-239, 2001.

PAPPENHEIMER, J.R. On the coupling of membrane digestion with intestinal absorption of sugars and amino acids. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.265, p.G409-G417, 1993.

PÉTRY, E.R.; CRUZAT, V.F.; ALVARENGA, M.L.; HECK, T.G.; ROSA, T.G.; BITTENCOURT Jr., P.I.H.; TIRAPEGUI, J. Alanyl-glutamine or glutamine plus alanine solution induces heat shock protein 70, heat shock factor 1 expression, attenuates muscle damage and oxidative stress in trained rats. **Journal of Applied Physiology: Cell Physiology**, 2012 [Em Submissão].

PITHON-CURI, T.C.; SCHUMACHER, R.I.; FREITAS, J.J.S.; LAGRANHA, C.; NEWSHOLME, P.; PALANCH, A.C.; DOI, S.Q.; CURI, R. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v.284, p.C1355-C1361, 2003.

QUILLARD, M.; HUSSON, A.; LAVOINNE, A. Glutamine increases arginosuccinate synthase mRNA levels of rat hepatocytes: the involvement of cell swelling. **European Journal of Biochemistry**, v.236, p.56-59, 1996.

RANGEL-FRAUSTO, M.S.; PITTET, D.; COSTIGAN, M.; HWANG, T.; DAVIS, C.S.; WENZEL, R.P. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study. **JAMA, Journal of the American Medical Association**, v.273, p.117-123, 1995.

RAY, E.C.; AVISSAR, N.E.; VUKCEVIC, D.; TOIA, L.; RYAN, C.K.; BERLANGA-ACOSTA, J.; SAX, H.C. Growth hormone and epidermal growth factor together enhance amino acid transport systems B(0,+) and A in remnant small intestine after massive enterectomy. **Journal of Surgical Research**, v.115, p.164-170, 2003.

RERAT, A.; SIMOES-NUNES, C.; MENDY, F.; VAISSADE, P.; VAUGELADE, P. Splanchnic fluxes of amino acids after duodenal infusion of carbohydrate solutions containing free amino acids or oligopeptides in the non-anaesthetized pig. **British Journal of Nutrition**, v.68, p.111-138, 1992.

RHOADS, J.M.; ARGENZIO, R.A.; CHEN, W.J.M.; RIPPE, R.A.; WESTWICK, J.K.; COX, A.D.H.; BERSCHNEIDER, M.; BRENNER, D.A. L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.272, p.G943-G953, 1997.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Considerações nutricionais e bioquímicas da suplementação de glutamina em atletas: controvérsias e aspectos atuais. **Journal of Metabolism and Nutrition**, v.7, n.4, p.106-117, 2003.

- ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.; PEDROSA, R.G.; CASTRO, I.A.; PIRES, I.S.O.; OLIVEIRA, A.A.; SALGADO, M.M.; PINTO, A.R.; UEDA, M. Efeito da suplementação com L-alanyl-L-glutamina sobre a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio em ratos submetidos ao treinamento intenso. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, p.487-497, 2002.
- ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.; PEDROSA, R.G.; CASTRO, I.A.; PIRES, I.S.O. Effect of L-alanyl-L-glutamine supplementation on the plasma and tissue concentrations of glutamine in rats submitted to exhaustive exercise. **Nutrition**, v.22, p.564-571, 2006.
- ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.; PEDROSA, R.G.; PIRES, I.S.O.; CASTRO, I.A. Plasma and tissue glutamine response to acute and chronic supplementation with L-glutamine and l-alanyl-L-glutamine in rats. **Nutrition Research**, v.24, p.261-270, 2004.
- ROTH, E. Nonnutritive effects of glutamine. **Journal of Nutrition**, v.138, p.2025S-2031S, 2008.
- ROTH, E.; FUNOVICS, J.; MUHLBACHER, F.; SCHEMPER, M.; SPORN, P.; FRITSCH, A. Metabolic disorders in severe abdominal sepsis: glutamine deficiency in skeletal muscle. **Clinical Nutrition**, v.1, p.25-41, 1982.
- ROTH, E.; OEHLER, R.; MANHART, N.; EXNER, R.; WESSNER, B.; STRASSER, E.; SPITTLER, A. Regulative potencial of glutamine-relation to glutathione metabolism. **Nutrition**, v.18, p.217-221, 2002.
- ROUHIAINEN, A.; TUMOVA, S.; VALMU, L.; KALKKINEN, N.; RAUVALA, H. Pivotal advance: analysis of proinflammatory activity of highly purified eukaryotic recombinant HMGB1 (amphoterin). **Journal of Leukocyte Biology**, v.81, p.49-58, 2007.
- ROWBOTTOM, D.G.; KEAST, D.; MORTON, A.R. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. **Sports Medicine**, v.21, p.80-97, 1996.
- SAKIYAMA, T.; MUSCH, M.W.; ROPELESKI, M.J.; TSUBOUCHI, H.; CHANG, E.B. Glutamine increases autophagy under Basal and stressed conditions in intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**, v.136, p.924-932, 2009.
- SALES Jr., J.A.L.; DAVID, C.M.; HATUM, R.; SOUZA, P.C.S.P.; JAPIASSÚ, A.; PINHEIRO, C.T.S.; FRIEDMAN, G.; SILVA, O.B.; DIAS, M.D.A.; KOTERBA, E.; DIAS, F.S.; CLÁUDIO PIRAS, C.; LUIZ, R.R. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepse em unidades de terapia intensiva brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.18, p.9-17, 2006.
- SALVALAGGIO, P.R.; CAMPOS, A.C. Bacterial translocation and glutamine. **Nutrition**, v.18, p.435-437, 2002.
- SANTOS, R.G.C.; VIANA, M.L.; GENEROSO, S.V.; ARANTES, R.E.; CORREIA, M.I.T.D.; CARDOSO, V.N. Glutamine supplementation decreases intestinal permeability and preserves gut mucosa integrity in an experimental mouse model. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.34, p.408-413, 2010.

SAPPINGTON, P.L.; YANG, R.; YANG, H.; TRACEY, K.J.; DELUDE, R.L.; FINK, M.P. HMGB1 B box increases the permeability of caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. **Gastroenterology**, v.123, p.790-802, 2002.

SARANTOS, P.; OCKERT, K.; SOUBA, W.W. Endotoxin stimulates lymphocyte glutaminase expression. **Archives of Surgery**, v.128, p.920-924, 1993.

SATOH, O.; KUDO, Y.; SHIKATA, H.; YAMADA, K.; KAWASAKI, T. Characterization of amino-acid transport systems in guinea-pig intestinal brush-border membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.985, p.120-126, 1989.

SCHEIERMANN, P.; HOEGL, S.; HOFSTETTER, C.; PFEILSCHIFTER, J.; ZWISSLER, B.; MÜHL, H.; BOOST, K.A.; SCHELLER, B. Comparing hemodynamics, blood gas analyses and proinflammatory cytokines in endotoxemic and severely septic rats. **International Immunopharmacology**, v.11, p.719-723, 2011.

SCHULMAN, A.S.; WILLCUTTS, K.F.; CLARIDGE, J.A.; EVANS, H.L.; RADIGAN, A.E.; O'DONNELL, K.B.; CAMDEN, J.R.; CHONG, T.W.; McELEARNEY, S.T.; SMITH, R.L.; GAZONI, L.M.; FARINHOLT, H.M.; HEUSER, C.C.; LOWSON, S.M.; SCHIRMER, B.D.; YOUNG, J.S.; SAWYER, R.G. Does the addition of glutamine to enteral feeds affect patient mortality? **Critical Care Medicine**, v.33, p.2501-2506, 2005.

SHIH, V.E.; BIXBY, E.M.; ALPERS, D.H.; BARTOSCAS, C.S.; THEIR, S.O. Studies of intestinal transport defect in Hartnup disease. **Gastroenterology**, v.61, p.445-453, 1971.

SHU, H.J.; TAKEDA, H.; SHINZAWA, H.; TAKAHASHI, T.; KAWATA, S. Effect of lipopolysaccharide on peptide transporter 1 expression in rat small intestine and its attenuation by dexamethasone. **Digestion**, v.65, p.21-29, 2002.

SILK, D.B.; GRIMBLE, G.K.; REES, R.G. Protein digestion and amino acid and peptide absorption. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.44, n.1, p.63-72, 1985.

SILVA, E.; PEDRO, M.A.; SOGAYAR, A.C.; MOHOVIC, T.; SILVA, C.L.; JANISZEWSKI, M.; CAL, R.G.; SOUSA, E.F.; ABE, T.P.; ANDRADE, J.; MATOS, J.D.; REZENDE, E.; ASSUNÇÃO, M.; AVEZUM, A.; ROCHA, P.C.; MATOS, G.F.; BENTO, A.M.; CORRÊA, A.D.; VIEIRA, P.C.; KNOBEL, E.; BRAZILIAN SEPSIS EPIDEMIOLOGICAL STUDY. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, v.8, n.4, p.R251-R260, 2004.

SINGLETON, K.D.; BECKEY, V.E.; WISCHMEYER, P.E. Glutamine prevents activation of NF- κ B and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. **Shock**, v.24, p.583-589, 2005.

SINGLETON, K.D.; WISCHMEYER, P.E. Glutamine induces heat shock protein expression via O-glycosylation and phosphorylation of HSF-1 and Sp1. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.32, p.371-376, 2008.

SOUBA, W.W. Intestinal glutamine metabolism and nutrition. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.4, n.1, p.2-9, 1993.

SOUBA, W.W.; AUSTGEN, T.R. Interorgan glutamine flow following surgery and infection. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.14, p.90S-93S, 1990.

SOUBA, W.W.; HERSKOWITZ, K.; KLIMBERG, V.S.; SALLOUM, R.M.; PLUMLEY, D.A.; FLYNN, T.C.; COPELAND, E.M. The effects of sepsis and endotoxemia on gut glutamine metabolism. **Annals of Surgery**, v.211, p.543-551, 1990.

STEIGER, M.; SENN, M.; ALTREUTHER, G.; WERLING, D.; SUTTER, F.; KREUZER, M.; LANGHANS W. Effect of a prolonged low-dose lipopolysaccharide infusion on feed intake and metabolism in heifers. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2523-2532, 1999.

SUZUKI, I.; MATSUMOTO, Y.; ADJEL, A.A.; ASATO, L.; SHINJO, S.; YAMAMOTO, S. Effect of glutamine supplemented diet on response to methicillin resistant staphylococcus ureus infection in mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.39, p.405-410, 1993.

SWAILS, W.S.; BELL, S.J.; BORLASE, B.C.; FORSE, R.A.; BLACKBURN, G.L. Glutamine content of whole proteins: implications for enteral formulas. **Nutrition in Clinical Practice**, v.7, n.2, p.77-80, 1992.

TALUKDER, J.R.; KEKUDA, R.; SAHA, P.; ARTHUR, S.; SAUDARAM, U. Identification and characterization of rabbit small intestinal villus cell brush border membrane Na-glutamine cotransporter. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.295, p.G7-G15, 2008.

TAMAI, H.; HORIE, Y.; KATO, S.; YOKOYAMA, H.; ISHII, H. Long-term ethanol feeding enhances susceptibility of the liver to orally administered lipopolysacchrides in rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.26, p.75S-80S, 2002.

TANG, Z.F.; LING, Y.B.; LIN, N.; HAO, Z.; XU, R.Y. Glutamine and recombinant human growth hormone protects intestinal barrier function following portal hypertension surgery. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, p.2223-2228, 2007.

TANIDA, I.; MINEMATSU-IKEGUCHI, N.; UENO, T.; KOMINAMI, E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. **Autophagy**, v.1, p.84-91, 2005.

TAYLOR, P.M.; EGAN, C.J.; RENNIE, M.J. Transport of glutamine across blood-facing membranes of perfused rat jejunum. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.256, p.E550-E558, 1989.

TISDALE, M.J. Molecular pathways leading to cancer cachexia. **Physiology**, v.20, p.340-348, 2005.

TSUBUKU, S.; HATAYAMA L.K.; MAWATARI, K.; SMRIGA, M.; KIMURA, .Thirteen-week oral toxicity study of L-glutamine in rats. **International Journal of Toxicology**, v.23, p.107-112, 2004.

TWEEDELL, A.; MULLIGAN, K.X.; MARTEL, J.E.; CHUEH, F.; SANTOMANGO, T.; McGUINNESS, O.P. Metabolic response to endotoxin *in vivo* in the conscious mouse: role of interleukin-6. **Metabolism**, v.60, p.92-98, 2011.

ULLOA, L.; OCHANI, M.; YANG, H.; TANOVIC, M.; HALPERIN, D.; YANG, R.; CZURA, C.J.; FINK, M.P.; TRACEY, K.J. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, p.12351-12356, 2002.

VAN WINKLE, L.J.; CAMPIONE, A.L.; GORMAN, J.M. Na-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates. **Journal of Biological Chemistry**, v.263, p.3150-3163, 1988.

VARY, T.C. Inter-organ protein and carbohydrate metabolic relationships during sepsis: necessary evils or uncanny coincidences? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.2, n.3, p.235-242, 1999.

VARY, T.C. Regulation of skeletal muscle protein turnover during sepsis. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.1, n.2, p.217-224, 1998.

WALD, A.; RAKEL, D. Behavioral and complementary approaches for the treatment of irritable bowel syndrome. **Nutrition in Clinical Practice**, v.23, n.3, p.284-292, 2008.

WANG, L.; MAHER, T.J.; WURTMAN, R.J. Oral L-glutamine increases GABA levels in striatal tissue and extracellular fluid. **FASEB Journal**, v.21, p.1227-1232, 2007.

WATFORD, M. Glutamine metabolism and function in relation to proline synthesis and the safety of glutamine and proline supplementation. **Journal of Nutrition**, 138, p.2003-2007, 2008.

WELBOURNE, T.C. Interorgan glutamine flow in metabolic acidosis. **American Journal of Physiology: Renal Fluid and Electrolyte Physiology**, v.253, n.6, pt.2, p.F1069-F1076, 1987.

WELBOURNE, T.C.; JOSHI, S. Interorgan glutamine metabolism during acidosis. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.14, p.77S-85S, 1990.

WERNERMAN, J. Clinical use of glutamine supplementation. **Journal of Nutrition**, v.138, p.2040S-2044S, 2008.

WILDE, S.W.; KILBERG, M.S. Glutamine transport by basolateral plasma-membrane vesicles prepared from rabbit intestine. **Biochemical Journal**, v.277, p.687-691, 1991.

WILMORE, D.W.; SHABERT, J.K. Role of glutamine in immunologic responses. **Nutrition**, v.14, p.618-626, 1998.

WILSON, T.H.; WISEMAN, G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. **Journal of Physiology**, v.123, p.116-125, 1954.

WINDMUELLER, H.G. Glutamine utilization by the small intestine. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v.53, p.201-237, 1982.

WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. Respiratory fuels and nitrogen metabolism *in vivo* in small intestine of fed rats. **Journal of Biological Chemistry**, v.255, p.107-112, 1980.

WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels *in vivo* for postabsorptive rat small intestine. **Journal of Biological Chemistry**, v.253, p.69-76, 1978.

WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from the blood. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.171, p.662-672, 1975.

WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. **Journal of Biological Chemistry**, v.249, p.5070-5079, 1974.

WIREN, M.; MAGNUSSON, K.E.; LARSSON, J. The role of glutamine, serum and energy factors in growth of enterocytelike cell lines. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.30, p.1331-1336, 1998.

WISCHMEYER P.E. Glutamine and heat shock protein expression. **Nutrition**, v.18, p.225-228, 2002.

WISCHMEYER, P.E.; LYNCH, J.; LIEDEL, J.; WOLFSON, R.; RIEHM, J.; GOTTLIEB, L.; KAHANA, M. Glutamine administration reduces Gram-negative bacteremia in severely burned patients: a prospective, randomized, double-blind trial versus isonitrogenous control. **Critical Care Medicine**, v.29, p.2075-2080, 2001.

WISCHMEYER, P.E. Glutamine: role in critical illness and ongoing clinical trials. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.24, p.190-197, 2008.

WISCHMEYER, P.E. Can glutamine turn off the motor that drives systemic inflammation? **Critical Care Medicine**, v.33, p.1175-1178, 2005.

WISCHMEYER, P.E.; RIEHM, J.; SINGLETON, K.D.; REN, H.; MUSCH, M.W.; KAHANA, M.; CHANG, E.B. Glutamine attenuates tumor necrosis factor- α release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells. **Nutrition**, v.19, p.1-6, 2003.

WOOLFSON, A.M.J. Amino acids - their role as energy source. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.42, p.489-495, 1983.

YANG, R.; MIKI, K.; OKSALA, N.; NAKAO, A.; LINDGREN, L.; KILLEEN, M.E.; MENNANDER, A.; FINK, M.P.; JYRKI TENHUNEN, J. Bile high-mobility group box 1 contributes to gut barrier dysfunction in experimental endotoxemia. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.297, p.R362-R369, 2009.

YEH, S.L.; LAI, Y.N.; SHANG, H.F.; LIN, M.T.; CHEN, W.J. Effects of glutamine supplementation on innate immune response in rats with gut-derived sepsis. **British Journal of Nutrition**, v.91, p.423-429, 2004.

YOSHIDA, S.; YAMASSKI, K.; KARBERA, A. Glutamine supplementation in septic rats. **Nippon Geka Gakkai Zasshi**, v.94, p.1078-1085, 1993.

YOUNG-GYU, K.; KIM, E.K.; KIM, T.; PARK, H.; PARK, H.S.; CHOI, E.J.; KIM, S. Glutamine-dependent antiapoptotic interaction of human glutaminyl-tRNA synthetase with apoptosis signal-regulating kinase I. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.6030-6036, 2001.

ZHOU, Y.P.; JIANG, Z.M.; SUN, Y.H.; WANG, X.R.; MA, E.L.; WILMORE, D. The effect of supplemental enteral glutamine on plasma levels, gut function, and outcome in severe burns: a randomized, double-blind, controlled clinical trial. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.27, p.241-245, 2003.

ZIEGLER, T.R.; BENFELL, K.; SMITH, R.J.; YOUNG, L.S.; BROWN, E.; FERRARI-BALIVIERA, E.; LOWE, D.K.; WILMORE, D.W. Safety and metabolic effects of L-glutamine administration in humans. **JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.14, p.137S-146S, 1990.

ZIEGLER, T.R.; OGDEN, L.G.; SINGLETON, K.D.; LUO, M.; FERNANDEZ-ESTIVARIZ, C.; GRIFFITH, D.P.; GALLOWAY, J.R.; WISCHMEYER, P.E. Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically ill patients. **Intensive Care Medicine**, v.31, p.1079-1086, 2005.

ZIEGLER, T.R.; YOUNG, L.S.; BENFELL, K.; SCHELTINGA, M.; HORTOS, K.; BYE, R.; MORROW, F.D.; JACOBS, D.O.; SMITH, R.J.; ANTIN, J.H. Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. **Annals of Internal Medicine**, v.116, p.821-828, 1992.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUAOfício CEUA/FCF/92/2011

São Paulo, 11 de outubro de 2011.

Ilmo. Sr.
Prof. Julio Orlando Tirapegui Toledo
FBA

Senhor Pesquisador,

A Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP, em reunião realizada em 10 de outubro de 2011, **aprovou a inclusão da aluna Mariana Lindenberg Alvarenga** no projeto "Efeito da suplementação com glutamina livre e na forma de dipeptídeo sobre vias de sinalização protéica e sistema imunitário em camundongos submetidos a endotoxemia" (Protocolo CEUA/FCF/249) o qual foi aprovado por esta Comissão em 10/08/2009.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP